



Universidade Federal de São Paulo
Programa de Pós-Graduação em Química - Ciência e Tecnologia da
Sustentabilidade

PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA
LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Ellen Luna de Barros
Dissertação de Mestrado

Diadema
2018

Ellen Luna de Barros

Preparação de nanopartículas de quitosana para liberação de fármacos

Dissertação apresentada como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências junto ao Programa de Pós-Graduação em Química - Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade, do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Augusto Bizeto

Laboratório de Materiais Híbridos
Departamento de Química
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas
Universidade Federal de São Paulo

Diadema
29 de novembro de 2018

Barros, Ellen Luna de

Preparação de nanopartículas de quitosana para liberação
de fármacos / Ellen Luna de Barros – – Diadema, 2018.
71 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade) -
Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2018.

Orientador: Marcos Augusto Bizeto

1. Nanopartículas. 2. Quitosana. 3.Síntese. 4. Carregadores de
fármacos.

I. Título.

CDD 615. 19



Universidade Federal de São Paulo
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Química - Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade



ATA DE REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TESE DE MESTRADO

Ao dia 29 de novembro do ano de dois mil e dezoito, reuniu-se na Sala 09 – Unidade Antonio Doll – Rua Antonio Doll de Moraes, 105 - Centro – Diadema/SP, às 13:30h00, a Comissão Julgadora para a **DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, solicitada por **ELLEN LUNA DE BARROS**, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em **QUÍMICA - CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA SUSTENTABILIDADE - CAMPUS DIADEMA**, que apresentou dissertação sob o Título: **“Preparação de Nanopartículas de Quitosana para Liberação de Fármacos”**.

A referida Comissão esteve constituída pelos Professores Doutores:

Titulares:

- Profa. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino

Professora

Universidade de São Paulo

- Profa. Dra. Paula Sílvia Haddad Ferreira

Professora

Universidade Federal de São Paulo

- Prof. Dr. Classius Ferreira da Silva

Professor

Universidade Federal de São Paulo

Suplentes:

- Profa. Dra. Roselena Faez

Professora

Universidade Federal de São Carlos

- Profa. Dra. Cristiana Maria Pedroso Yoshida

Professora

Universidade Federal de São Paulo

O(A) presidente da banca, **Prof. Dr. Marcos Augusto Bizeto**, iniciou a sessão dando a palavra ao(à) candidato(a), que dispôs de vinte a trinta minutos, no máximo, para expor sua tese. A seguir, deu a palavra aos professores para a arguição. Cada examinador dispôs de trinta minutos, no máximo, para arguição, bem como o(a) candidato(a), para resposta. Tendo o(a) candidato(a) respondido todas as arguições em tempo hábil, os membros da Banca Examinadora emitiram seus pareceres:



Universidade Federal de São Paulo
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Química - Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade



Profs. Drs.:

(Aprovado(a) () Reprovado(a) ())

Vera Regina Leopoldo Constantino

Vera Regina Constantino - APROVADA

Paula Silvia Haddad Ferreira

APROVADA

Classius Ferreira da Silva

APROVADA

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera **ELLEN LUNA DE BARROS**, APROVADA (Aprovado(a)/Reprovado(a) a receber o título de MESTRE EM CIÊNCIAS pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. Por estarem de acordo, assinam a presente ata.

Vera Regina Constantino

Prof. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino

Paula

Prof. Dra. Paula Silvia Haddad Ferreira

Classius

Prof. Dr. Classius Ferreira da Silva

Marcos Augusto Bizeto

Prof. Dr. Marcos Augusto Bizeto

Sugestões e observações:

O texto deve ser revisado conforme sugestões da banca examinadora.

São Paulo, 29 de novembro de 2018.

Dedico este estudo à minha família, em especial, aos meus pais Gino e Wasti.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.

Aos meus pais Gino e Wasti e meus familiares e amigos pelo apoio, confiança, paciência e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Augusto Bizeto, obrigada por ter aceitado ser meu orientador, obrigada pelo acompanhamento ao longo do mestrado.

A todos os colegas do LMH/Unifesp.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para execução deste trabalho.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que eu era antes”.*

Marthin Luther King

RESUMO

Carreadores de fármacos propiciam maneiras mais eficientes para a administração de princípios ativos que apresentem alguma restrição de uso. Neste estudo, a quitosana, que é um biopolímero semissintético de origem renovável, foi transformada em nanopartículas para carregamento de fármacos e outras moléculas bioativas. A preparação das nanopartículas foi feita pelos métodos da coacervação e de gelificação ionotrópica. As nanopartículas formadas em dispersão aquosa foram analisadas por medidas de potencial ζ e de espalhamento dinâmico de luz. As nanopartículas isoladas por centrifugação foram analisadas por difratometria de raios X e espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier. O fármaco modelo utilizado neste estudo foi o ibuprofeno, o qual foi incorporado às nanopartículas pelo método de síntese direta. A posterior liberação foi avaliada em pH 6,0 e 8,0 e, também, em fluido corporal simulado (pH 7,2), que é um meio que mimetiza o fluido intracelular. Modelos cinéticos representativos de diferentes formas farmacêuticas de liberação modificada foram aplicados à curva experimental de liberação do ibuprofeno em fluido corporal simulado.

Os resultados demonstraram que a síntese por coacervação não produziu as nanopartículas com as características desejadas (baixo índice de polidispersividade e potencial ζ elevado) em nenhuma das condições experimentais testadas. A síntese por gelificação produziu as nanopartículas com as características coloidais desejadas quando utilizada a proporção em massa de quitosana : tripolifosfato de sódio de 3 : 1 na preparação das nanopartículas. A eficiência de incorporação do ibuprofeno por síntese direta foi de aproximadamente 91 %, resultando em um material contendo 21 % em massa do fármaco incorporado na rede polimérica na forma de pequenos cristais e de moléculas adsorvidas.

A quantidade de ibuprofeno liberada após 240 min em meio ácido (30 %) foi maior do que em básico (10 %), que é a condição na qual este fármaco é bem mais solúvel. Este resultado fato demonstrou a atuação da nanopartícula de quitosana na modificação da disponibilidade do fármaco, como esperado para um carreador. Em fluido corporal simulado foi liberado 32 % do ibuprofeno incorporado nas nanopartículas considerando ao longo dos 240 min de monitoramento. A cinética de liberação se ajustou ao modelo de Korsmeyer-Peppas, aplicado às matrizes poliméricas, sendo o mecanismo de liberação no período avaliado dominado pela difusão do fármaco localizado mais próximo da superfície da partícula.

Palavras chaves: nanopartículas, quitosana, ibuprofeno, liberação modificada, gelificação ionotrópica

ABSTRACT

Drug carriers provide a more efficient manner to administer drugs that have restrictions in the use. In this study, chitosan, which is a semi synthetic biopolymer produced from a renewable source, has been transformed into nanoparticles to act as carriers for drugs and other bioactive molecules. The preparation of the nanoparticles was carried out using the coacervation and ionotropic gelation methods. The formed nanoparticles in aqueous dispersion were analyzed by zeta potential and dynamic light scattering of measurements. Nanoparticles isolated by centrifugation were analyzed by X-ray diffractometry and Fourier transformed infrared absorption spectroscopy. Ibuprofen was the model drug used in this study. This drug was incorporated directly into the nanoparticles during the synthesis step. The drug release from the chitosan nanoparticles was evaluated in phosphate buffer with pH 6.0 and 8.0 and also in simulated body fluid (pH 7.2), which is a medium that mimics the physiological chemical conditions of intracellular fluid. Representative kinetic models of different pharmaceutical forms of drug release dosage were applied to the experimental curve of ibuprofen release in simulated body fluid.

The synthetic method based on coacervation did not produce the nanoparticles with the desired characteristics of low index of polydispersity and high zeta potential, in none of the experimental conditions evaluated. The ionotropic gelation method produced the nanoparticles with the desired colloidal characteristics when a mass ratio of chitosan and sodium tripolyphosphate of 3 : 1 was used during the preparation of the nanoparticles. The ibuprofen incorporation by using direct synthesis was around 91%, resulting in a material containing 21% by mass of the drug incorporated into the polymer network as tiny crystals and adsorbed molecules. The amount of ibuprofen released after 240 min in acid medium (30 %) was higher than in basic medium (10 %), which is the condition where the drug is way more soluble. This result demonstrated the role of the chitosan nanoparticle in modifying the ibuprofen solubility, as expect for a drug carrier. In simulated body fluid, 32% of the ibuprofen incorporated into the nanoparticles was released after the 240 min of monitoring. The experimental release kinetics adjusted to the Korsmeyer-Peppas model, ascribed for polymer matrices, with the release mechanism dominated in the monitored period by the diffusion of the drug located closest to the surface of the particle.

Keywords: nanoparticles, chitosan, ibuprofen, controlled release, ionotropic gelation method

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. QUITOSANA.....	2
1.1.1. Origem.....	2
1.1.2. Estrutura e propriedades físico-químicas.....	3
1.1.3. Reatividade.....	4
1.1.4. Propriedades.....	5
1.1.4.1. Atividade antimicrobiana.....	5
1.1.4.2. Biocompatibilidade e citotoxicidade.....	6
1.1.4.3. Promoção de cicatrização.....	6
1.1.4.4. Biodegradabilidade.....	7
1.1.4.5. Mucoadesividade.....	7
1.1.4.6. Ação homeostática.....	8
1.1.5. Aplicações Biomédicas.....	9
1.1.5.1. Liberação controlada de espécies bioativas.....	9
1.1.5.2. Curativos.....	9
1.1.5.3. Suportes celulares (scaffolds) para engenharia tecidual.....	9
1.2. NANO- E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	10
1.2.1. Rotas de obtenção de nanopartículas.....	11
1.2.1.1. Com agentes reticulantes.....	12
1.2.1.2. Métodos por emulsão.....	12
1.2.1.3. Secagem por spray.....	13
1.2.1.4. Gelificação ionotrópica.....	13
1.2.1.5. Coacervação / precipitação.....	15
1.2.2. Nanopartículas de quitosana em liberação de fármacos e espécies bioativas.....	16
1.3. IBUPROFENO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
3.1. REAGENTES.....	20
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	20
3.2.1. Síntese das nanopartículas por coacervação.....	20

3.2.2. Síntese das nanopartículas por gelificação ionotrópica.....	21
3.2.3. Incorporação do ibuprofeno nas nanopartículas por síntese direta.....	22
3.2.4. Ensaios de liberação.....	23
3.2.4.1. Verificação da influência do pH.....	23
3.2.4.2. Em fluido corporal simulado (pH 7,2)	23
3.2.4.1. Estudo Cinético.....	24
3.3. TÉCNICAS E EQUIPAMENTOS USADOS NA CARACTERIZAÇÃO	26
3.3.1. Potencial ζ e Espalhamento Dinâmico de Luz.....	26
3.3.2. Difratometria de raios X.....	26
3.3.3. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier	27
3.3.4. Espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA QUITOSANA DE PARTIDA.....	28
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	32
4.2.1. Método da coacervação.....	32
4.2.2. Método da gelificação ionotrópica.....	35
4.3. INCORPORAÇÃO DO IBUPROFENO NAS NANOPARTÍCULAS E ENSAIOS DE LIBERAÇÃO.	39
4.3.1. Ensaios de Liberação	42
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7. CURRÍCULO	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Monômero da quitosana totalmente desacetilada.	3
Figura 2 – Representação da estrutura cristalina da quitosana anidra com célula unitária ortorrômbica. ¹⁵ Os átomos de C são representados em verde, os de N em azul e de O em vermelho.	4
Figura 3 - Estrutura da quitosana reticulada com (a) glutaraldeído; (b) genipina e (c) epicloridrina. ¹⁶	5
Figura 4 - Tipos de nanopartículas: (a) nanoesferas; (b) micela polimérica com núcleo e revestimento; (c) macromolécula de dendrímero, (d) lipossomo com bicamada lipídica; (e) nanocápsula de material core-shell. ³⁸	10
Figura 5 – Esquema do processo de gelificação ionotrópica da quitosana com TPP. Adaptado de Tripathy et al. 2012. ⁴⁵	14
Figura 6- Estrutura molecular do ibuprofeno - ácido (RS)-2-(4 isobutilfenil)propanóico.	17
Figura 7 - Esquema mostrando as etapas da síntese de NP-quit por coacervação com EDTA.	21
Figura 8 - Esquema da síntese de NP-quit por gelificação com TPP.....	22
Figura 9 - Difratoograma de raios X da quitosana registrado na forma de pó.....	28
Figura 10 - Espectro de FTIR da quitosana de partida.....	29
Figura 11 – Faixa espectral usada na determinação do grau de acetilação da quitosana com base na absorbância das bandas referentes aos estiramentos de O-H (3450 cm^{-1}) e carbonilas (1655 cm^{-1}). As linhas de base LB1 e LB2 foram utilizadas como referências para a determinação do valor da absorbância.	30
Figura 12 - Espectro eletrônico de absorção na região do UV-Vis da solução estoque de quitosana ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em HAc ($1\%\text{ v}\cdot\text{v}^{-1}$).	31

Figura 13 – Curva de distribuição do tamanho hidrodinâmico por DLS das partículas de quitosana na solução estoque 1 % $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$ em HAc (1% $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$).	32
Figura 14 – Fotografias dos frascos contendo as dispersões formadas após a síntese por coacervação usando as proporções em massa de quitosana : EDTA de 3 : 1, 5 : 1 e 10:1.....	33
Figura 15 – Difrátogramas de raios X registrados dos precipitados isolados da síntese por coacervação com EDTA e do EDTA sólido, incluído para comparação.	33
Figura 16 – Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana produzidas por coacervação registrada em função da intensidade da luz espalhada.....	34
Figura 17 – Potencial ζ das nanopartículas de quitosana nas dispersões formadas após a síntese por coacervação nas diferentes proporções de quit:EDTA utilizadas.	35
Figura 18 – Fotografias dos frascos contendo as dispersões formadas após a síntese por gelificação ionotrópica usando proporções em massa de quitosana:TPP de 3:1, 5:1 e 10:1....	35
Figura 19 - Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana produzidas por gelificação ionotrópica registrada em função da intensidade da luz espalhada.	37
Figura 20 - Potencial ζ das nanopartículas de quitosana nas dispersões formadas após a síntese por gelificação ionotrópica nas diferentes proporções em massa de quitosana : TPP utilizadas.....	37
Figura 21 – Difrátogramas de raios X da nanopartícula produzida usando a proporção em massa quitosana: TPP de 3 :1 (NP-quit) e do tripolifosfato de sódio (TPP).	38
Figura 22 – Espectro de FTIR da nanopartícula produzida usando a proporção em massa quitosana : TPP de 3 : 1 (NP-quit) e do tripolifosfato de sódio (TPP).	39
Figura 23 – Espectros eletrônicos de absorção no UV da solução antes e após a incorporação do ibuprofeno nas nanopartículas de quitosana.	40

Figura 24 – (a) Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana com ibuprofeno incorporado (Ibu@NP-quit) e (b) potencial ζ medido na dispersão de Ibu@NP-quit.	40
Figura 25 – Difrátogramas de raios X das nanopartículas de quitosana após a incorporação de ibuprofeno (Ibu@NP-quit) e do ibuprofeno sólido.	41
Figura 26 – Espectros de FTIR das nanopartículas de quitosana após a incorporação de ibuprofeno (Ibu@NP-quit) e do ibuprofeno sólido.	42
Figura 27 – Curvas de liberação cumulativa do ibuprofeno incorporado em NP-quit em pH 6,0 e 8,0.	44
Figura 28 - Curva de liberação cumulativa do ibuprofeno incorporado em NP-quit em FCS (pH 7,2).	44
Figura 29 – Reta obtida por regressão linear dos dados experimentais da liberação do ibuprofeno em FCS segundo o modelo cinético de liberação de ordem zero.	45
Figura 30 - Reta obtida por regressão linear dos dados experimentais da liberação do ibuprofeno em FCS segundo o modelo cinético de liberação de Hixson-Crowell.....	46
Figura 31 - Reta obtida por regressão linear dos dados experimentais da liberação do ibuprofeno em FCS segundo o modelo cinético de liberação de Korsmeyer-Peppas.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados na preparação do fluído corporal simulado.....	24
Tabela 2 - Equações dos modelos cinéticos	25
Tabela 3. Significado do expoente n da equação de Korsmeyer-Peppas.....	25

LISTA DE ABREVIATÓES

AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
DA	Grau de desacetilação
DLS	Do inglês, Dynamic Light Scattering
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FCS	Fluído corporal simulado
GA	Glutaraldeído
HAc	Ácido acético
Ibu@NP-quit	Nanopartículas de quitosana com ibuprofeno incorporado
IL-1 β	Interleucina- β 1
IL-2	Interleucina-2
NP	Nanopartícula
NP-quit	Nanopartículas de quitosana
NPs	Nanopartículas
PA	Para análise
PDI	Índice de polidispersividade
PMN	Células polimorfonucleares
q.s.p.	Quantidade suficiente para
TGF- β	Fator estimulador de crescimento
TNF- α	Fatores estimulador de necrose tumoral
TPP	Tripolifosfato de sódio

1. INTRODUÇÃO

Os carreadores são formas farmacêuticas sofisticadas de entrega de fármacos e espécies bioativas, capazes de modificar e/ou controlar a disponibilidade no organismo, possibilitando a redução de efeitos colaterais.¹ Por essa razão são sistemas de transporte e liberação de fármacos que proporcionam uma eficiência maior do que a conseguida com a administração via comprimidos ou intravenosa. Do ponto de vista funcional, espera-se que os carreadores transportem e protejam a espécie ativa da degradação no meio fisiológico até a liberação em um tecido ou célula alvo, de maneira a não afetar os tecidos saudáveis.² Produzir o carreador ideal torna-se cada vez mais possível pelos avanços na nanociência. Dispositivos em escala nanométrica como as nanopartículas (NPs) melhoram a biodisponibilidade da espécie ativa e possibilitam uma liberação mais efetiva no sítio alvo.^{3,4} Isso porque as NPs permeiam mais eficientemente as barreiras do organismo e devido a sua maior área superficial disponível para adsorção, propicia maior solubilidade para moléculas insolúveis (ou pouco solúveis).³ Além disso, as NPs também agregam maior capacidade de modificação química visando a interação com diferentes moléculas e sítios de ação, propiciando maior flexibilidade ao método de transporte e liberação de fármacos.³

Nanocarreadores podem melhorar significativamente a administração de fármacos de classe IV. Segundo a ANVISA os fármacos desta classe apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade no organismo, como, também, baixa biodisponibilidade oral. Um exemplo de fármaco classe IV é o Ibuprofeno (Ibu - ácido (2R)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanóico). Este anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) tem propriedades analgésicas e antitérmicas, sendo um dos fármacos classificados como essenciais pela Organização Mundial de Saúde. Contudo, seu uso prolongado pode provocar gastrite ou úlcera no estômago devido a interferir na produção da barreira de proteção da mucosa

gástrica. Estes efeitos adversos podem ser reduzidos pela liberação controlada de dosagens menores apenas no sítio de ação utilizando-se nanopartículas.

Existem carreadores nanométricos de origem química orgânica, inorgânica e híbrida, sendo os mais utilizados terapeuticamente os poliméricos e lipídicos (lipossomos e micelas)⁵⁻⁷. Dentre os poliméricos, a quitosana ganha destaque por ser um biopolímero de originado de fonte renovável, com baixa toxicidade e de fácil modificação química. Devido à composição química da cadeia polimérica, a quitosana apresenta mucoadesividade,^{8,9} o que permite, por exemplo, que as NPs entreguem o ibuprofeno diretamente nas mucosas em baixa quantidade, evitando efeitos colaterais.¹⁰ Outra vantagem da quitosana é ser um polímero responsivo ao pH ácido, sendo útil como carreador de fármacos para tratar patologias que acidificam os tecidos como alguns tipos de câncer e inflamações.¹¹

1.1. Quitosana

1.1.1. Origem

A quitina é o biopolímero de onde a quitosana é produzida. É o segundo biopolímero mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose, e é encontrada, principalmente, no exoesqueleto de artrópodes (crustáceos e insetos) como matrizes peritróficas (membrana presente nos insetos), lulas, conchas de moluscos, cascas de ovos de nematoides e em cistos de protozoários.¹² As fontes industriais mais comuns são as cascas de crustáceos dos resíduos da indústria pesqueira, sendo seu uso também ecológico e mais sustentável devido ao seu caráter renovável.

No processo de obtenção da quitosana a partir da desacetilação da quitina, primeiramente, ela é separada da carapaça dos crustáceos por um processo químico que envolve a desmineralização realizada com soluções diluídas de HCl e NaOH e a posterior descoloração pelo tratamento com KMnO₄ e ácido oxálico. A quitina assim obtida contém

grupos acetil (NHCOCH_3) que são removidos com NaOH concentrado em uma etapa posterior para produzir a quitosana.¹²

1.1.2. Estrutura e propriedades físico-químicas

A quitosana, também chamada de poliglusam, quitina desacetilada ou poli-D-glucosamina, é um copolímero formado pelos polissacarídeos N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose unidos por ligações β -1,4 glicosídicas (Figura 1). As unidades acetiladas estão distribuídas ao longo da cadeia polimérica em diferentes quantidades determinadas pelo grau de desacetilação. A quitosana é na verdade um polímero com graus de desacetilação variando de 40 a 98% e massa molar média entre 50 e 2000 kDa.¹³ A massa molar média da quitina é geralmente maior do que 10^6 Da.¹⁴

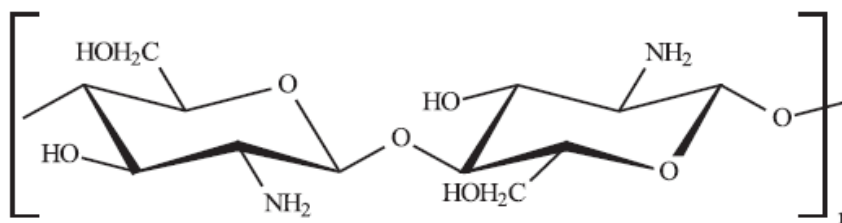


Figura 1 – Monômero da quitosana totalmente desacetilada.

As cadeias poliméricas da quitosana são lineares e mantidas unidas principalmente por ligações de hidrogênio e interações fracas do tipo van der Waals. Regiões com maior organização estrutural (cristalinas) são formadas onde existe maior número dessas ligações intermoleculares.¹³ A célula unitária da quitosana com baixa massa molar e que sofreu desacetilação completa é ortorrômbica, contendo duas cadeias antiparalelas sem moléculas de água hidratação entre elas (Figura 2).^{13,15}

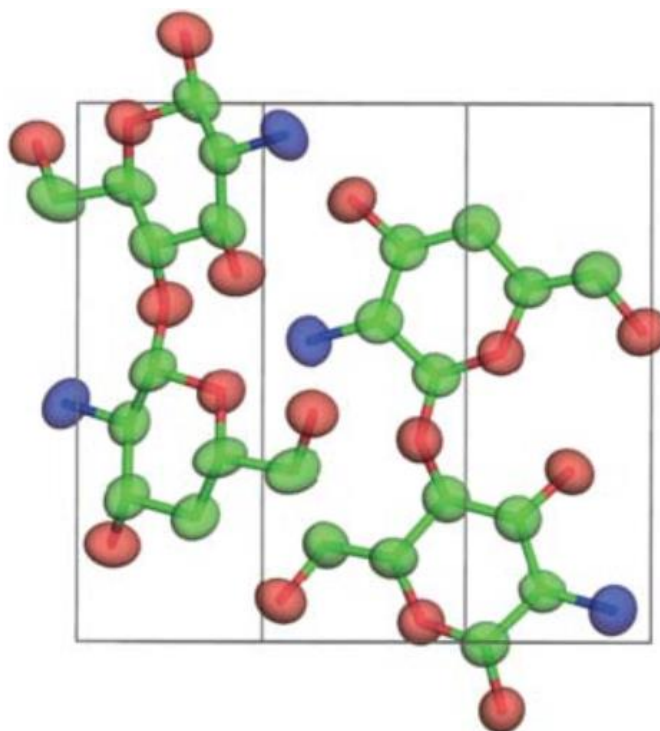


Figura 2 – Representação da estrutura cristalina da quitosana anidra com célula unitária ortorrômbica.¹⁵ Os átomos de C são representados em verde, os de N em azul e de O em vermelho.

Apesar de quimicamente semelhantes, o menor grau de desacetilação da quitosana confere diferenças significativas em suas propriedades físico-químicas.¹² Enquanto a quitina é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, a quitosana é solúvel em soluções de ácidos diluídos, devido à protonação dos grupos amino primários ($-NH_2$) de sua cadeia, que a transformam em um polieletrólito catiônico hidrossolúvel. Esse grupos amino conferem a quitosana uma série de propriedades que a quitina não possui.^{12,13} Assim, as propriedades da quitosana variam com o grau de desacetilação e a massa molar média.¹³ Estas por sua vez são influenciadas pela fonte da quitina usada como matéria-prima e dos métodos de preparação.^{12–}

14

1.1.3. Reatividade

A quitosana é um polieletrólito com grupos amino e hidroxilas reativos, com capacidade de quelar metais de adsorção de diferentes tipos de substâncias.^{13,16} Grupos amino reagem com carbonilas de aldeídos formando ligações covalentes, como no caso do glutaraldeído, que

é um agente reticulante para a quitosana devido a formação de ligações imina (Figura 3a).¹⁶ Além do glutaraldeído, o glioxal, o formaldeído, a genipina e a epícloridrina também são utilizados na modificação da quitosana por serem capazes de formar ligações covalentes não só com o grupo amino, mas também com a hidroxila, como é o caso da genipina (Figura 3b) e da epícloridrina (Figura 3c).¹⁶ As hidroxilas da cadeia polimérica da quitosana, também, podem sofrer reações de N-acetilação, N-alquilação, N-carboxilação, N-sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas.

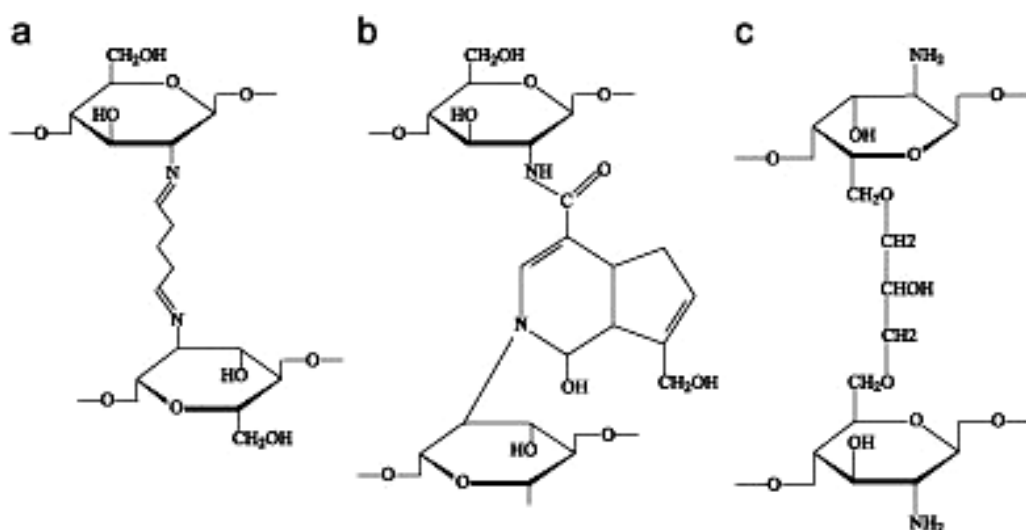


Figura 3 - Estrutura da quitosana reticulada com (a) glutaraldeído; (b) genipina e (c) epícloridrina.¹⁶

1.1.4. Propriedades

A quitosana reúne diferentes propriedades como baixa toxicidade, biodegradabilidade, ação antimicrobiana, hemostasia e grande capacidade absorviva, que a torna um material interessante para diversas aplicações biomédicas.^{13,17}

1.1.4.1. Atividade antimicrobiana

A quitosana apresenta atividade antimicrobiana, contudo, o mecanismo exato de ação ainda não é completamente conhecido.¹⁸ O espectro de ação abrange fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo mais eficaz contra bactérias gram-positivas.¹⁸ O modelo de ação mais aceito para explicar a atividade antimicrobiana da quitosana baseia-se na interação

eletrostática com a membrana celular.¹⁸ A interação entre o grupo protonado ($-\text{NH}_3^+$), possivelmente, compete com os íons Ca^{2+} pelos sítios da membrana.¹⁸ Esta interação permite que a quitosana se acople nos derivados de agarose ativos das bactérias, provocando alteração da hidrofiliabilidade e densidade de carga da superfície celular, produzindo, assim, danos na membrana.¹⁹ A quitosana também inibe a formação de biofilmes.

1.1.4.2. Biocompatibilidade e citotoxicidade

A avaliação da biocompatibilidade descreve a reação inflamatória e imunogênica que um material estranho provoca em contato com tecidos vivos. A biocompatibilidade da quitosana depende da origem da fonte de obtenção, da forma de processamento, da massa molar e do grau de desacetilação, mas no geral, em ensaios feitos in vivo, esse biopolímero mostra-se ser biocompatível.^{20,21} Ensaios clínicos não relataram qualquer reação inflamatória ou alérgica após implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão no corpo humano.²²

Estudos não demonstraram citotoxicidade da quitosana em linhagens de fibroblastos L-929, apresentando ainda capacidade de blindar toxicidade outra partícula, protegendo as células.²³

1.1.4.3. Promoção de cicatrização

Existe uma relação direta entre cicatrização e o processo inflamatório desencadeado. Porém, um processo inflamatório crônico de longo prazo resulta em danos aos tecidos. A quitosana é capaz de atuar em ambos processos estimulando o sistema imune e, também, inibindo a ativação e a expressão da metaloproteinase-2 da matriz em fibroblastos humanos. Desta maneira a quitosana estimula a cicatrização tecidual.²⁴

O efeito imunoestimulador da quitosana é atribuída aos grupos N-acetil-D-glucosamina que ativam resposta inflamatória em neutrófilos PMN, macrófagos e fibroblastos. Nos macrófagos a quitosana promove a produção de TGF- β e do PDGF (fator de crescimento

derivado de plaquetas por monócitos humanos), ambos envolvidos na resposta inflamatória. E os oligômeros de quitosana também estimulam a liberação de TNF- α e de IL-1 β .

A estimulação os macrófagos, por sua vez, estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno (tipo I, III e IV),²⁵ consequentemente promovendo a cicatrização. Ao aderirem aos fibroblastos a quitosana também favorece a proliferação de queratinócitos.²² Oligômeros e quitosana de baixo peso também estimulam a N-acetilglicosaminidase, que a hidrolizam em componentes da matriz extracelular e unidades necessárias à biossíntese do ácido hialurônico.

1.1.4.4. Biodegradabilidade

Biodegradabilidade é um ponto importante no metabolismo a ser respeitado em sistemas de liberação de medicamentos. Um polímero biodegradável é aquele que o organismo consegue desconstruir por diferentes mecanismos, resultando em quebra das cadeias e sua eliminação do organismo. A biodegradação pode ocorrer por processos biológicos; como ação de enzimas, micro-organismos ou células. Porém, efeitos físicos e químicos também podem atuar na biodegradação.²⁶ A quitosana degrada-se em metabólitos (amino açúcares) completamente absorvíveis pelo corpo humano. Enzimas como a lisosima são capazes de degradar a quitosana bem como os radicais livres, como óxido nítrico (NO), liberados por macrófagos.²⁴ Portanto, os efeitos inflamatórios provocados pela quitosana auxiliam em sua degradação e consequente eliminação do organismo.

1.1.4.5. Mucoadesividade

Por mucoadesividade entende-se a capacidade de um material se aderir à mucosa. Por sua vez, para que esta adesão ocorra o material deve interagir física e mecanicamente com a mucina presente no muco.²⁷ O muco é um gel composto de água, sais, proteínas, células, bactérias e lipídios que recobre as mucosas expostas ao ambiente externo,²⁸ sendo mucina a

glicoproteína formadora deste gel. A quitosana protonada interage facilmente com superfícies negativas e pode aderir aos tecidos, principalmente epiteliais.

A mucosa é também constantemente lavada por fluídos e agitada por vigoroso movimento muscular involuntário.²⁸ Como por exemplo na superfície ocular e no lúmen gastrointestinal. Ou seja, o muco é uma barreira para os fármacos cuja administração requer travessia. Convencionalmente, eleva-se a concentração dos fármacos para que o montante absorvido esteja dentro da concentração terapêutica. Em outras palavras, grande parcela do medicamento é eliminada o que eleva os custos e os riscos de criar cepas resistentes, no caso dos antibióticos.

Sistemas de revestimento com habilidade mucoadesiva aumentam a disponibilidade de dado fármaco, reduzindo custos e elevando o efeito terapêutico. Contudo, o sistema de entrega precisa resistir ao muco e as condições severas da mucosa.²⁸ A quitosana apresenta mucoadesividade relacionada as interações eletrostáticas de seus grupos funcionais catiônicos com os componentes aniônicos do muco como a mucina e o ácido siálico, além da própria superfície epitelial.²⁸ Outras interações como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas também contribuem, mas dependem do grau de acetilação da quitosana.²⁹ Assim, elevar o grau de desacetilação da quitosana, e conseqüentemente sua solubilidade aquosa também aprimora suas propriedades mucoadesivas.

1.1.4.6. Ação homeostática

Existe comprovada ação homeostática na quitosana por sua habilidade de acelerar a cicatrização ao mediar efeitos inflamatórios, ativar células do sistema imune e induzir a produção de matriz extra celular.³⁰ Além disso, a quitosana pode ativar a coagulação sanguínea ao interagir com as membranas dos eritrócitos e plaquetas.²⁵ Desta maneira, também existe aplicação da quitosana para o tratamento de hemorragias na forma de ataduras e curativos.

1.1.5. Aplicações Biomédicas

1.1.5.1. Liberação controlada de espécies bioativas

A quitosana protege a espécie ativa da degradação em meio fisiológico e permite liberação modificada. A habilidade de transportar fármacos somada a interação da quitosana com membranas celulares, mucosas, polímeros e partículas inorgânicas aniônicas³¹ melhora a eficiência dos tratamentos farmacológicos. Esta eficiência dos sistemas transportadores de fármacos é potencializado em escala nanométrica por apresentar maior permeabilidade nos tecidos.²⁵ Em nanopartículas o composto ativo pode estar dissolvido, retido, encapsulado, adsorvido ou quimicamente ligado a quitosana.³² E dependendo da espécie ativa e também do tamanho desta partícula a aplicação pode abranger:

1.1.5.2. Curativos

Ensaio de citocompatibilidade de filmes de quitosana com queratinócitos e fibroblastos demonstraram que a quitosana é um bom biomaterial para promover a cicatrização superficial de feridas,^{22,25} o que permite o uso da quitosana em controle de hemorragias e curativos para feridas,³³ produtos esses já disponíveis comercialmente.³⁴

1.1.5.3. Suportes celulares (scaffolds) para engenharia tecidual

Scaffolds (suportes celulares) são estruturas sólidas 3D que simulam a matriz extra celular permitindo a fixação, proliferação, diferenciação e orientação do crescimento de células. São estruturas com poros interligadas que permitem o transporte de nutrientes e resíduos através da matriz.³⁵ Estas estruturas podem ser aplicadas na formação de tecidos ou ainda para liberação de fármacos. Os scaffolds restringem-se a materiais com alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioabsorvível pelo organismo, características estas cotempladas pela quitosana seja aplicada em scaffolds após processamento por técnicas usuais.³⁵

Dong et al.³⁶ utilizou impressora 3D para criar scaffolds de quitosana com hidroxiapatita para simular tecido ósseo e auxiliar na regeneração. O tecido ósseo é um composto orgânico-inorgânico estruturado hierarquicamente, onde hidroxiapatita e fibrilas de colágeno tipo I são organizadas em nanoescala.

1.2. Nano- e micropartículas de quitosana

Nanociências é a área do conhecimento responsável pelo estudo das propriedades da matéria em escala micro e nano. O conceito nanociência surgiu com Richard Philips Feynman, em 1959, quando propôs que novos materiais pudessem ser obtidos por manipulação atômica. Contudo, apenas na década de 1980 com o surgimento dos microscópicos de alta resolução é que houveram grandes avanços no entendimento das propriedades.

Para a área da saúde, nanotecnologia define estruturas menores de 1.000 nm projetadas para apresentar propriedades específicas (European Medicines Agency).³⁷ Materiais particulados em escala nanométrica apresentam grande potencial e versatilidade para a entrega localizada de fármacos.³⁸ Estas estruturas podem ser orgânicas (ex. polímeros, lipídios) ou inorgânicas (ex. metálicas, cerâmicas) e apresentar diferentes arranjos estruturais como nanoesferas, nanocápsulas, micelas ou lipossomos, dendrímeros ou macromoléculas (Figura 4).

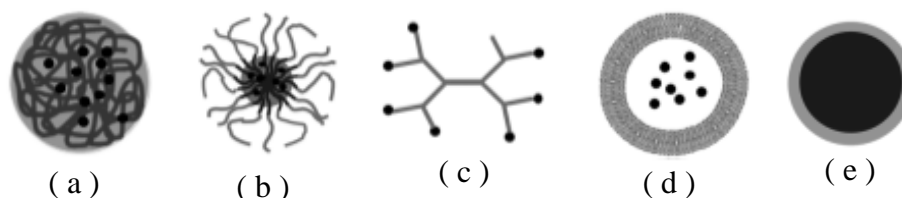


Figura 4 - Tipos de nanopartículas: (a) nanoesferas; (b) micela polimérica com núcleo e revestimento; (c) macromolécula de dendrímero, (d) lipossomo com bicamada lipídica; (e) nanocápsula de material core-shell.³⁸

As vantagens das NPs em comparação com materiais *bulk* como carreadores de fármacos se deve principalmente pelo seu tamanho reduzido, ou seja, um aumento na área de

superfície em relação ao seu volume. Outras vantagens das nanopartículas permite maior controle sobre a liberação em sítios de ação específicos, sobre a velocidade e sobre o regime de dosagem de substâncias.³² O tempo de permanência das NPs é prolongado quando comparado com as formulações convencionais porque a eliminação é menor. Consequentemente, há maior biodisponibilidade dos fármacos. Ademais, há diminuição de efeitos colaterais, por exemplo, anti-inflamatórios não-esteroidais (diclofenaco e ibuprofeno) frequentemente causam irritação à mucosa gastrointestinal. Esses fármacos quando protegidos em NPs não são degradados no trato gastrointestinal, sendo absorvidos em quantidade terapêutica.²⁵

Como outros polímeros biodegradáveis, NP-quit apresenta grande potencial terapêutico por apresentar maior estabilidade nos fluidos biológicos.³² Explorando também a mucoadesividade da quitosana, é ideal usa-la como carreadora de fármacos para o tratamento torna-se alvo específico. NPs-quit são simples e tem baixo custo de preparação, dispensando o uso de calor e solventes orgânicos.³²

1.2.1. Rotas de obtenção de nanopartículas

Existem diferentes métodos para a síntese de NP-quit que serão descritos neste item. Normalmente, obter NP-quit envolve a ligação cruzada entre as suas cadeias em solução, seja covalentemente ou interações fracas como ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas ou associações hidrofóbicas.^{25,39} As NP-quit com cadeias menos compactas apresentam maior liberação dos fármacos incorporados, e o inverso ocorre com cadeias mais compactas.³⁹ Externamente, as forças que formam a NP-quit influenciam além de seus limites físicos e afetar a estabilidade delas em emulsão. Forças atrativas muito intensas podem, por exemplo, agregar as partículas. E forças muito fracas desintegrarão as NP-quit. Portanto, um equilíbrio deve ser atingido.

1.2.1.1. Com agentes reticulantes

O uso de agentes reticulantes é comum em alguns métodos de síntese de NP-quit. As ligações cruzadas entre as cadeias de quitosana pode ser realizado com glutaraldeído (GA) (Figura 3), glicerol, epicloridina, glioxal, formaldeído ou genipina.¹⁶ Na reticulação ocorre a ligação imina entre os grupos amino da quitosana com os grupos aldeído do agente reticulante. Desta maneira diferentes cadeias de quitosana são conectadas covalentemente imobilizando-as e impedindo a sua solubilização. As ligações imina são irreversíveis e resistem a valores extremos de pH e temperatura.^{16,40}

Apesar de inicialmente parecer uma vantagem a irreversibilidade das ligações entre GA e quitosana restringe a modulação da NP-quit. Perde-se a capacidade de controlar a velocidade de liberação da partícula e também sua ação alvo específica dependente de pH. Os agentes reticulantes em si são tóxicos e seus resíduos reduzem a biocompatibilidade das NP-quit. Outro inconveniente é possibilidade de ocorrer reações químicas com o fármaco.²⁵

1.2.1.2. Métodos por emulsão

Uma emulsão é formada com surfactante dissolvido em solvente orgânico (n-hexano). A solução de quitosana em ácido acético e o reticulante (glutaraldeído ou formaldeído) são adicionados a emulsão sob agitação constante à temperatura ambiente até que as ligações cruzadas entre as moléculas de quitosana ocorram e as NP-quit se formem.²⁵

Outra possibilidade é produzir uma emulsão óleo/água com surfactante em água e a solução de quitosana é adicionada a emulsão sob agitação mecânica, seguida de homogeneização em alta pressão. Ao diluir a emulsão em água o solvente orgânico atinge-se o índice de solubilidade do solvente. Neste momento o solvente orgânico difunde-se para a água levando a formação de NP-quit. Este métodos são adequados a substâncias hidrofóbicas e apresenta alto grau de incorporação. O fato de não utilizar agente reticulante mantém alta biocompatibilidade das NP-quit. Entretanto, o uso de solventes orgânicos elevam a toxicidade

do sistema e o cisalhamento necessário para produção pode danificar o fármaco a ser incorporado.²⁵

1.2.1.3. Secagem por spray

Baseia-se na secagem de partículas por um fluxo de ar quente. A quitosana dissolvida em ácido acético é adicionado a substância a ser incorporada e o agente reticulante. A mistura é em seguida é introduzida por spray em um fluxo de ar quente formando e secando as pequenas gotas de solução em NP-quit. O tamanho das NP-quit dependerá da pressão, temperatura do ar e da vazão do nebulizador.²⁵ A vantagem deste método é a velocidade de produção que também elimina processos posteriores de diálise ou purificação das NPs. Há também alto controle no tamanho das NPs. A desvantagem é que a temperatura pode impedir que este método seja aplicado em fármacos facilmente degradados.

1.2.1.4. Gelificação ionotrópica

Este método também chamado de complexo polieletrônico, é o mais utilizado para obter NP-quit, pois não requer o uso de solventes orgânicos ou agentes reticulantes. É baseado na interação eletrostática entre os grupamentos amino da quitosana e as cargas negativas de um poliânion.^{32,41} Solução de quitosana positiva (NH_3^+) interage com solução de cargas negativas dos poliânions como o tripolifosfato de sódio - TPP (PO_3^{-4})⁴² ou sulfato de dextran (DS).⁴³ Um complexo (Figura 5) é então formado com interações iônicas inter e intramoleculares.^{41,44,45} A desvantagem deste método reside na complexidade dos fenômenos envolvidos. Normalmente o sistema obtido é polidisperso, sem uniformidade no tamanho de partículas. Isso porque há muitos parâmetros e variáveis que influenciam na formação do sistema.⁴³ Por exemplo, o grau de desacetilação da quitosana dentre outros fatores que interferem nas NP-quit são: i) a concentração da quitosana; ii) a massa molar da quitosana; iii) a proporção entre quitosana e TPP; iv) o pH; e v) a força iônica do meio usado na preparação.³⁹

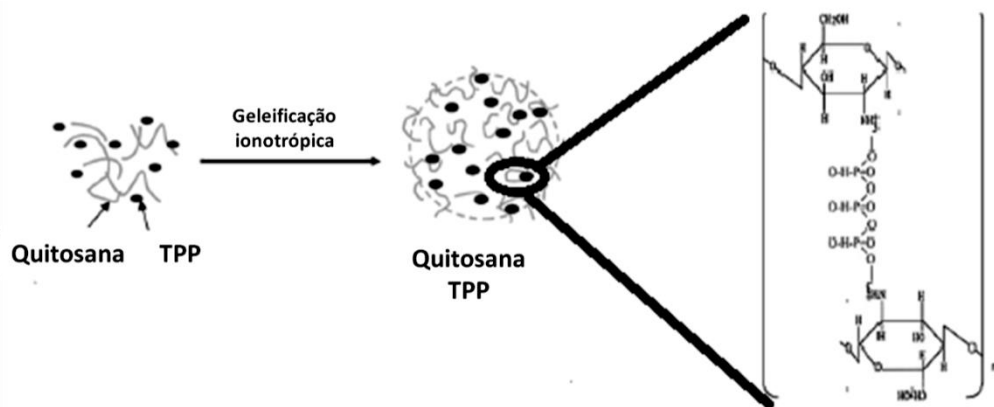


Figura 5 – Esquema do processo de gelificação iônica da quitosana com TPP. Adaptado de Tripathy et al. 2012.⁴⁵

A concentração de quitosana nas NP-quit é diretamente proporcional ao seu massa molar⁴⁶ e relaciona ao tamanho das partículas sintetizada. É possível também reduzir o tamanho médio das NP-quit por cisalhamento mecânico⁴⁶ após a síntese. Ou por ultrassom através do efeito de cavitação. A temperatura potencializa ambos processos de quebra.

O pH do meio influencia no grau de protonação da quitosana e portanto na quantidade de grupos amino disponíveis. Quitosana pouco catiônica apresentará também poucas ligações com TPP resultando em NP-quit maiores e menos compactas.

A quantidade de TPP também altera diretamente a quantidade de conexões no complexo e a compactação das moléculas e, conseqüentemente, o tamanho das NP-quit.³⁹ A compactação também modula a velocidade de liberação do fármaco encapsulado. A quantidade de DS em excesso favorece a formação de NPs com superfície negativas. Portanto, pode-se variar o potencial ζ da partícula de acordo com sua composição, que pode por sua vez influenciar a incorporação de fármacos.⁴³

O aumento da força iônica gera NPs menores e mais compactas. Nessas condições a proporção entre TPP e quitosana influenciam menos no tamanho, sendo estas mais homogêneas. Força iônica afeta também a estabilidade das NP-quit. Com maior força iônica e maior compactação (menor tamanho) a velocidade de liberação do fármaco diminui. A redução do tamanho aumenta por sua vez a absorção das NP-quit e o fármaco incorporado. A

salinidade do meio pode também reduzir o potencial ζ das NP-quit desestabilizando-as.³⁹ Suspensões instáveis agregam-se e precipitam reduzindo a disponibilidade das NPs e consequentemente seu efeito como transportador de fármaco. Então, para permanecerem dispersas as NPs precisam de cargas elétricas efetivas para que as NP sejam capazes de repelirem-se. O tipo de ânion adicionado também é importante segundo a série de Hofmeister.³¹ Ânions caotrópicos ($\text{ClO}_4^- > \text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$) produzem NPs menos hidratadas, com cadeia mais enoveladas e compactas, portanto, a liberação será mais lenta. Ânions cosmotrópicos ($\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{HCOO}^- > \text{F}^- > \text{OH}^- > \text{HPO}_4^{2-} > \text{SO}_4^{2-}$) produzem estruturas mais hidratadas,⁴⁷ e a NP apresentará liberação mais rápida.

1.2.1.5. Coacervação / precipitação

Coacervado é um aglomerado de moléculas envolvidas por água. Neste método de obtenção as NP são formadas aproveitando-se da insolubilidade da quitosana em meio alcalino.²⁵ A coacervação dá-se por complexação entre policação e poliânion, similar ao método de gelificação. A quitosana é dissolvida em meio ácido, e adicionada gota a gota a solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA),^{40,48} NaOH ou NaOH/metanol.²⁵ O tamanho das NPs varia com o tamanho das gotas, ou seja, pressão do ar e tipo de pulverizador. O complexo formado é então precipitado com etanol e o solvente é posteriormente removido por centrifugação e, por fim seco. A secagem pode ser realizada pelo método de spray-drying que eleva o controle sobre o tamanho das NPs. Neste caso o uso do etanol para a precipitação não é necessário com os perdigotos do spray secos a quente (50-170 °C).⁴⁹ A desvantagem é que desta maneira as ligações tornam-se mais fracas entre as moléculas de quitosana. Para elevar a força de ligação entre as moléculas de quitosana, as NP-quit podem ser reticuladas com glutaraldeído ou outro agente, que porém acrescenta as desvantagens já discutidas.

1.2.2. Nanopartículas de quitosana em liberação de fármacos e espécies bioativas

Dentro das nanopartículas de quitosana (NP-quit) os fármacos podem cruzar barreiras biológicas mantendo sua integridade, liberando-as controladamente.^{4,46} Fármacos podem também ter seus efeitos colaterais mitigados pelo uso de NP-quit. Por exemplo, a doxorubicina usada para o tratamento de câncer pode provocar cardiotoxicidade. Entretanto, conjugada as NP-quit a absorção e o tempo de vida do fármaco aumentam ao mesmo tempo que a sua concentração total diminui. Em ratos as NP-quit ajudaram a reter e a elevar a concentração de doxorubicina no colon. Um aumento na retenção das NP-quit também foi verificado em capilares pulmonares. O que propiciou maior liberação de paclitaxel em tumores com células negativamente carregadas e em ambiente ácidos.⁵⁰ Considerando que tecidos cancerosos apresentam pH citoplasmáticos mais ácido (pH 6,8) que os sadios (pH 7,4).⁵¹ Portanto, as NP-quit também apresentam aplicação antitumoral.

A quitosana tem a capacidade de estimular a resposta imune. Portanto, as NP-quit podem ser utilizadas terapeuticamente como um adjuvante em vacinas,²⁵ induzindo a endocitose e melhorando a resposta imunológica das mucosas ao ativar as células de defesa.^{25,50} Somando a mucoadesividade e capacidade de absorção da quitosana a peptídeos, tem-se um aumento do transporte pelo epitélio nasal.⁵⁰ Assim, microesferas de quitosana podem induzir melhor inoculação intranasal e de anticorpos IgG e IgA elevando também a proliferação de linfócitos.⁵⁰

Algo similar as vacinas pode ser alcançado com NP-quit combinadas a plasmídios de DNA (ex. partículas de Au-DNA) melhorando a imunidade antígeno-específica.^{50,52} A quitosana previne a degradação do DNA pelas nucleases que podem passar pelo trato gastrointestinal. Plasmídeos diferentes (pGL2 and pMK3) encapsulados em NP-quit não foram alterados em estrutura ou função. Podendo ser aplicados em imunoterapias gênicas, mas a expressão de IL-2 produzidas pelas células variou com a massa molar e a quantidade de quitosana usada.⁵⁰

1.3. Ibuprofeno

O Ibuprofeno foi sintetizado em 1961 por Adams, Nicholson e Burrows, popularizou-se em meados da década 1970 sendo atualmente usado por milhões de pessoas. O ibuprofeno é um anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) com propriedades analgésicas e antitérmicas. Ele é usado no tratamento de dores discretas e moderadas como em casos de artrite reumatoide, osteoartrite, dismenorréia primária (dores menstruais), traumatismos luxações, dores de dentes, e dor associada a qualquer processo inflamatório e em situações de febre de diversa etiologia.⁵³ E possui também propriedades anticoagulantes, diminuindo a formação de coágulos sanguíneos, fazendo parte da lista de fármacos essenciais da Organização Mundial de Saúde.⁵³

O ibuprofeno inibe a dor pela inibição da COX e consequente reduzi a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. As prostaglandinas, são substâncias produzidas pelo corpo que causam inflamação e contribuem para a percepção de dor pelo cérebro. Similarmente, este fármaco reduz a febre ao bloquear a síntese de prostaglandinas no hipotálamo, que regula a temperatura corporal.⁵³ É convertido em metabólitos inativos pelo fígado e excretados pela urina e bile. Por ser mais lipossolúvel penetra no sistema nervoso central mais facilmente e pode provocar leves alterações de humor e função cognitiva.⁵⁴

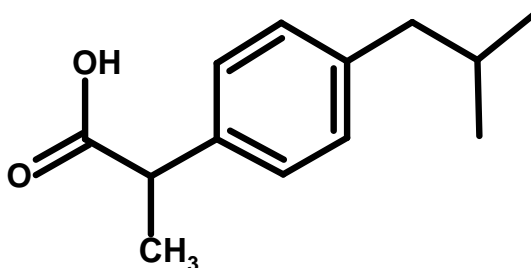


Figura 6- Estrutura molecular do ibuprofeno - ácido (RS)-2-(4 isobutilfenil)propanóico.

Ibuprofeno requer cautela de uso em asmáticos, alérgicos e casos de insuficiência cardíaca, hepática ou renal. Hipersensibilidade ao ácido acetilsalicílico também pode indicar

cautela. O uso prolongado pode provocar gastrite ou úlcera no estômago por bloquear a produção da barreira de proteção da mucosa gástrica.⁵³ Esses efeitos podem ser reduzidos pela liberação modificada utilizando NP-quit como carreador.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi produzir nanopartículas de quitosana para atuar na liberação modificada de fármacos.

Os objetivos específicos foram:

- sintetizar nanopartículas de quitosana pelos métodos da gelificação ionotrópica e por coacervação e comparar os resultados dessas sínteses para selecionar o procedimento que produz as nanopartículas com as seguintes características de interesse: menores tamanhos hidrodinâmicos com pouca polidispersividade;
- adaptar o método selecionado para incorporação direta do ibuprofeno;
- avaliar a nanopartícula produzida como carreador para liberação modificada do ibuprofeno em diferentes condições de pH
- verificar os fatores cinéticos envolvidos com a liberação do ibuprofeno em meio de fluido corporal simulado, por meio da aplicação de modelos matemáticos de mecanismos cinéticos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

Quitosana baixa massa molar e 80,3% desacetilação (Sigma Aldrich Inc.).

Tripolifosfato de Sódio - PA (Synth).

Ácido etilenodiamino tetra-acético PA (Synth).

Ibuprofeno (PharPlus).

Glutaraldeído - solução 25% (Sigma Aldrich)

Cloreto de Sódio PA (Synth).

Bicarbonato de Sódio PA (Synth).

Cloreto de Potássio PA (Sigma Aldrich).

Hidrogeno Fosfato de Potássio PA (Sigma Aldrich)

Cloreto de Magnésio PA (Sigma Aldrich).

Ácido Clorídrico PA (Synth).

Cloreto de Cálcio PA (Synth).

Sulfato de Sódio PA (Synth).

Tris Hidroximetil Aminoetano PA (Synth).

Solução estoque de quitosana: preparada pela dissolução da massa necessária para a preparação de uma solução $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em ácido acético (1 %, $\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) sob constante agitação mecânica a temperatura ambiente. Levou cerca de 1 hora para a dissolução completa.

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1. Síntese das nanopartículas por coacervação

NP-quit foram produzidas pelo método da coacervação complexa tendo como base o procedimento descrito na literatura⁵⁵ e mostrado esquematicamente na Figura 7. Um total de 0,05 g de quitosana foram dissolvidas em 10 mL de solução de EDTA nas proporções em

massa (quitosana : EDTA) de 3 : 1, 5 : 1 e 10 : 1. A dissolução foi feita sob agitação e aquecimento a 45°C por 24 h. Após este período, mesmo sem ter ocorrido a completa solubilização, 10 gotas de etanol (100%) foram adicionadas seguido da adição de 30µL de solução de GA (25% v.v⁻¹) mantendo sob agitação a 45°C por mais 4h. Em seguida, a suspensão obtida foi transferida para um sistema de diálise com membrana de 35 kDa de corte para purificação em água MilliQ, onde permaneceu por 48h. As NP-quit produzidas foram isoladas por centrifugação (4.400 rpm por 20 minutos) para as caracterizações no estado sólido. As NP-quit na forma sólida foram caracterizadas por difratometria de raios X (DRX), espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). E as dispersões foram caracterizadas por potencial zeta (ζ) e espalhamento dinâmico de luz (DLS).

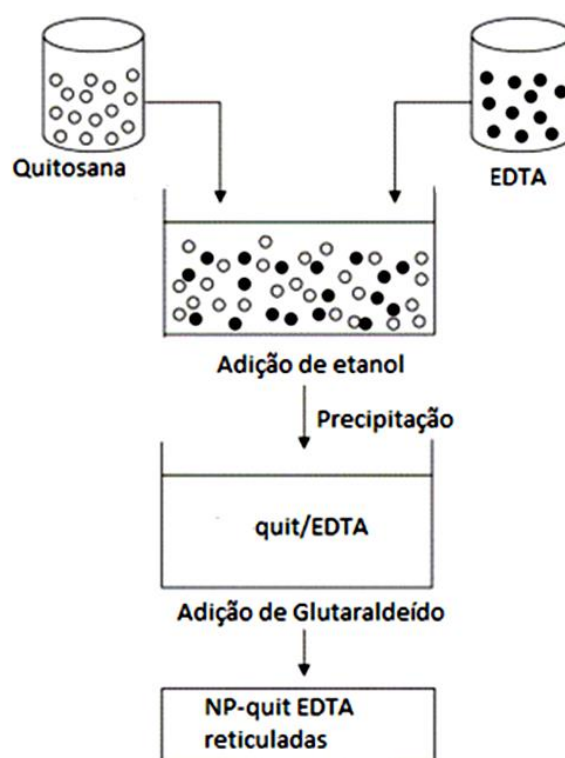


Figura 7 - Esquema mostrando as etapas da síntese de NP-quit por coacervação com EDTA.

3.2.2. Síntese das nanopartículas por gelificação ionotrópica

Volumes adequados de uma solução 1% (m.v⁻¹) de quitosana em ácido acético 1% (v.v⁻¹) foram misturados a uma solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) 1,8 mg.L⁻¹ nas

proporções em massa (quitosana:TPP) de 3 : 1, 5 : 1 e 10 : 1, conforme esquema mostrado na Figura 8. Em seguida, a dispersão obtida foi transferida para um sistema de diálise com membrana de 35 kDa de corte de massa para purificação em água MilliQ, onde permaneceu por 48h. As NP-quit produzidas foram isoladas por centrifugação (4.400 rpm por 20 minutos) para as caracterizações no estado sólido. O sólido de NP-quit foi caracterizado por difratometria de raios X, espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier. As dispersões de NP-quit foram caracterizadas por medidas de potencial ζ e espalhamento dinâmico de luz.

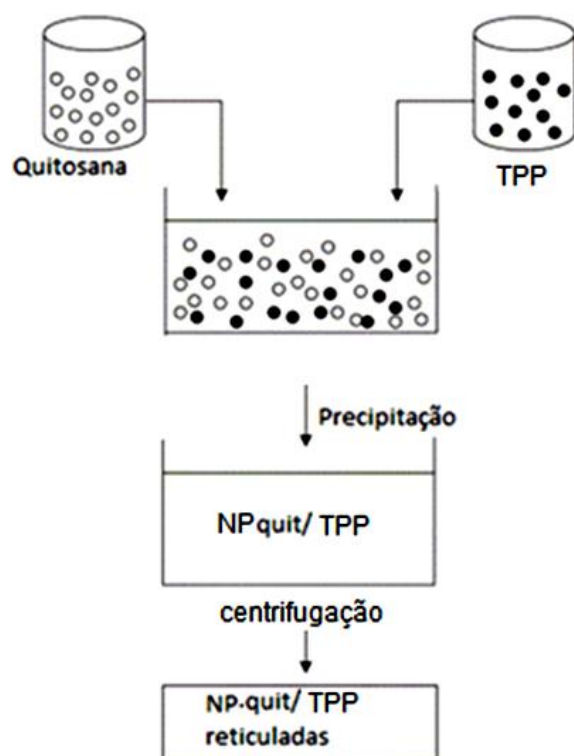


Figura 8 - Esquema da síntese de NP-quit por gelificação com TPP.

3.2.3. Incorporação do ibuprofeno nas nanopartículas por síntese direta

A incorporação do ibuprofeno nas nanopartículas ocorreu diretamente durante o processo de síntese. 0,612g de ibuprofeno foram dissolvidos na solução de TPP (0,72g de TPP em 400 mL de água purificada) e essa solução foi adicionada à solução de quitosana (1,2 g em 1200 mL de ácido acético 1%, v.v⁻¹) formando o material denominado Ibu@NP-quit. As

Ibu@NP-quit produzidas foram centrifugadas e resuspendidas em água por 4 vezes para purificação. Depois, o sólido isolado de Ibu@NP-quit foi seco em estufa à vácuo a 60°C. O rendimento do processo de síntese foi de 79%.

O Ibu@NP-quit isolado de foi caracterizado por difratometria de raios X, espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier. A dispersão foi caracterizada por medidas de potencial ζ e espalhamento dinâmico de luz.

3.2.4. Ensaios de liberação

3.2.4.1. Verificação da influência do pH

0,25g de Ibu@NP-quit foram dispersas em 25 mL de solução tampão fosfato com pH 6,0 (produzida pela mistura de 2,24 g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 12,15 g.L⁻¹ de KH₂PO₄) e com pH 8,0 (produzida pela mistura de 15,98 g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,84 g.L⁻¹ de KH₂PO₄). A liberação do ibuprofeno foi monitorada pela absorbância medida em 263 nm de alíquotas de 2 mL retiradas em intervalos de 30 minutos até o período total de 3 horas. As alíquotas foram filtradas em filtro de seringa 0,22 μ m para remoção das nanopartículas antes das medidas de absorbância. A cada alíquota retirada, 2 mL do tampão correspondente eram repostos para manter o volume constante. Um gráfico da porcentagem de liberação cumulativa em relação ao tempo foi montado corrigindo o efeito da diluição pela retirada das alíquotas.

3.2.4.2. Em fluido corporal simulado (pH 7,2)

Ensaios realizados em triplicata foram feitos pela dispersão de uma dada massa de Ibu@NP-quit (0,500g; 0,505g e 0,510g) em 165 mL de fluido corporal simulado (FCS) pH 7.2. O FCS foi preparado pela mistura dos compostos descritos na Tabela 3.⁵⁷ A liberação do ibuprofeno foi realizada a 37 °C sob agitação pela retirada de alíquotas de 2 mL em intervalos de 15 minutos durante 4 h e medindo a absorbância dessas alíquotas em 263 nm. Cada alíquota foi filtrada em um filtro de seringa de 0,22 μ m para remoção do material particulado antes das medidas de absorbância. A cada alíquota retirada, 2 mL de FCS eram repostos para

manter o volume constante. Um gráfico da porcentagem de liberação cumulativa em relação ao tempo foi montado corrigindo o efeito da diluição pela retirada das alíquotas.

Tabela 1: Reagentes utilizados na preparação do fluído corporal simulado.

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	8,035 g
2	NaHCO ₃	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	K ₂ HPO ₄	0,174 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311 g
6	HCl (1 mol.L ⁻¹)	39 mL
7	CaCl ₂	0,292 g
8	Na ₂ SO ₄	0,072 g
9	(HOCH ₂) ₃ CNH ₂	6,118 g
10	HCl (1 mol/L)	Gotas
11	H ₂ O (DI)	q.s.p. 1 L

3.2.4.1. Estudo Cinético

Sempre que uma nova forma farmacêutica é desenvolvida ou produzida é necessário assegurar que a dissolução do fármaco ocorra de maneira apropriada. A dissolução/liberação do fármaco a partir de formas sólidas pode ser descrita por modelos cinéticos matemáticos que correlacionam a quantidade dissolvida de droga (Q) em função do tempo de ensaio (t)

$$Q = f(t)$$

A função analítica f(t) é descrita por diferentes modelos cinéticos.⁵⁶ No presente estudo foram utilizados os modelos de ordem zero (descreve o processo convencional de liberação prolongada a partir de formas farmacêuticas que não degradam), de Korsmeyer-Peppas (descreve a liberação a partir do relaxamento das cadeias poliméricas) e de Hixson-Crowell (descreve a liberação a partir de formas farmacêuticas como comprimidos) os quais são aplicados conforme as equações mostradas na Tabela 2.⁵⁶

Tabela 2 - Equações dos modelos cinéticos

Modelo cinético	Equação	Gráfico Traçado
<i>Ordem zero</i>	$1 - (Q_t/Q_0) = k_0 t$	$[1 - (Q_t/Q_0)] \times t$
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	$Q_t/Q_\infty = k t^n$	$\text{Log}(Q_t/Q_\infty) \times \log(t)$
<i>Hixson-Crowell</i>	$[1 - (Q_t/Q_0)]^{1/3} = 1 - k_{\beta} t$	$\sqrt[3]{[1 - (Q_t/Q_0)]} \times t$

No *modelo de ordem zero* Q_0 corresponde a quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica, Q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t e k_0 é a constante de velocidade de liberação. O gráfico traçado da fração de fármaco não liberada pelo tempo será linear com a inclinação correspondendo à constante de velocidade.

O *modelo de Korsmeyer-Peppas* considera uma combinação da difusão com transporte anômalo controlado pelo relaxamento de cadeias poliméricas, onde o expoente n indica o mecanismo predominantemente envolvido conforme apresentado na Tabela 3. Este modelo é normalmente usado para analisar a liberação a partir de carreadores poliméricos onde o mecanismo de liberação não é conhecido ou quando tem mais de um mecanismo envolvido. Quando a cinética é descrita por este modelo, o gráfico do logaritmo da fração de fármaco liberada (Q_t/Q_∞) pelo logaritmo do tempo é linear, onde a inclinação corresponde ao expoente de Korsmeyer-Peppas e o intercepto ao log da constante de velocidade.

Tabela 3. Significado do expoente n da equação de Korsmeyer-Peppas.

Valor de n	Significado
< 0,5	difusão Fickiana
0,5 - 1,0	transporte anômalo
1,0	transporte de ordem zero
> 1,0	difusão não-Fickiana

O *modelo Hixson Crowell* é aplicado para formas farmacêuticas que não se degradam durante o processo de dissolução do fármaco. Quando é satisfeito, o gráfico traçado entre a raiz cúbica da percentagem de droga restante na matriz versus tempo é linear.

3.3. Técnicas e equipamentos usados na caracterização

3.3.1. *Potencial ζ e Espalhamento Dinâmico de Luz*

As suspensões de NP-quit e Ibu@NP-quit em água foram filtradas (0,22 μm) e analisadas em triplicata pelo Zetasizer (Malvern, localizado em IQ-USP). Analisou-se potencial ζ e espalhamento dinâmico de luz.

O potencial ζ , ou potencial eletrocinético, é uma técnica que caracteriza a carga da superfície das partículas em meio aquoso.⁵⁷ A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança formando de uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. A camada mais interna com íons fortemente ligados à superfície e a externa com íons em equilíbrio entre forças eletrostáticas e o movimento da partícula no meio. Portanto, o potencial ζ se relaciona com a repulsão eletrostática entre as partículas. É utilizado para determinar a estabilidade da suspensão coloidal. Partículas com cargas elevadas ($\pm 30\text{mV}$) repelem-se e o sistema é estável.⁵⁷ A medição ocorre ao aplicar uma diferença de potencial (E) enquanto se mede a velocidade (v) das partículas a 633 nm conforme a equação abaixo, onde ε é a constante dielétrica do solvente, ε_0 a constante de permissividade no vácuo e η a viscosidade do solvente.⁵⁷

$$v = (\varepsilon \times \varepsilon_0 \times \eta^{-1} \times \zeta) \times E$$

O mesmo equipamento mede o espalhamento dinâmico de luz (DLS) que determina o tamanho hidrodinâmico da partícula. Com uma curva de distribuição de tamanhos obtidos em várias análises consecutivas determina-se o índice de polidispersividade (PDI). O PDI é adimensional e tem o valor variando entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 0, mais monodispersas são as partículas em dispersão.

3.3.2. *Difratometria de raios X*

As amostras sólidas de Ibu@NP-quit, NP-quit, ibuprofeno e quitosana foram analisadas em difratômetro Rigaku (Modelo Miniflex - Instituto de Química - USP), usando raios X com

ângulos de 0-50 e radiação K_{α} do Cu. A atribuição dos picos foi realizada baseando-se em literatura indexada.

3.3.3. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier

Amostras sólidas foram transformadas em pastilha com KBr (1:1, m/m). Os espectros vibracionais das amostras foram obtidos por transmitância e refletância difusa (DRIFT) em equipamento Shimadzu, (Modelo IRPrestige-21) da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema. Os dados foram tratados em programa computacional Originv8.0 recebendo alisamento (smooth) e linha base (baseline) pelo método Savitzky-Golay (5 pontos) e interpolação Spline de ordem polinomial 2. A atribuição dos picos foi realizada baseando-se em literatura.

3.3.4. Espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível

Determinou-se a concentração de ibuprofeno em soluções aquosas a partir da banda de absorção como máximo em 263 nm em UV-Vis (OceanOptics, modelo USB4000) operado por fibra-ótica. Para tanto foi utilizada a lei de Beer (equação abaixo) que relaciona absorbância (A), o caminho ótico da cubeta (d) e a concentração da espécie estudada (C). O valor de ϵ utilizado foi de $301,6 \text{ mol.L.cm}^{-1}$, o qual foi determinado através de uma curva de calibração.

$$A = \epsilon.d.C$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização química da quitosana de partida

A quitosana é um polímero semicristalino cuja célula unitária pertence ao sistema cristalino ortorrômbico com grupo espacial $P2_12_12_1$.⁵⁸ O padrão observado no difratograma da quitosana em pó (Figura 9) mostra dois picos principais que são atribuídos aos planos cristalográficos (020) ($2\theta = 10,2^\circ$) e (200) ($2\theta = 20,3^\circ$). As dimensões da célula unitária calculadas através do difratograma registrado são: $a = 8,9 \text{ \AA}$ e $b = 17,3 \text{ \AA}$ que correspondem a forma hidratada da quitosana.⁵⁹

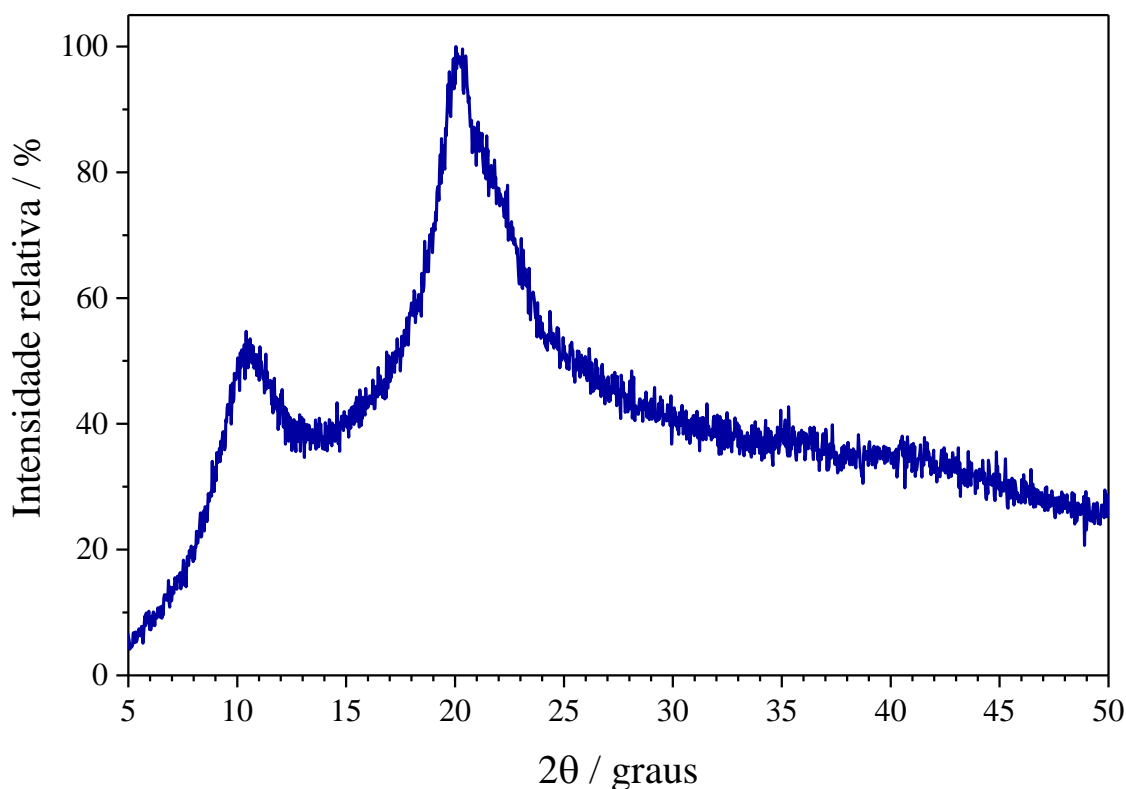


Figura 9 - Difratograma de raios X da quitosana registrado na forma de pó.

Com base no espectro de FTIR registrado (Figura 10), foi feita a atribuição dos modos vibracionais da quitosana. Em 3580 e em 3065 cm^{-1} ocorrem o estiramento das ligações dos grupos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$ da cadeia polimérica. As bandas em 2950 e 2880 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos antissimétrico e simétrico das ligações C-H dos grupos metila e metileno da

cadeia polimérica. Na região de 1665 cm^{-1} , há a banda amida I da quitosana, que se refere ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ dos grupos acetilados. Em 1550 cm^{-1} é observada a banda de amida II referente à deformação angular da ligação N-H e ao estiramento da ligação C-N . Na região de 1435 e em 1365 cm^{-1} ocorrem as bandas relacionadas com a deformação angular antissimétrica de ligações C-H da cadeia polimérica. Em 1320 cm^{-1} aparece a amida III, que se refere ao estiramento da ligação C-N e à deformação angular da ligação N-H e na mesma região também ocorre o estiramento antissimétrico da ligação C-O-C . Em 1150 e 990 cm^{-1} são observadas as bandas do estiramento antissimétrico C-O-C das ligações glicosídicas ou o estiramento C-O da ligação C-OH .⁶⁰

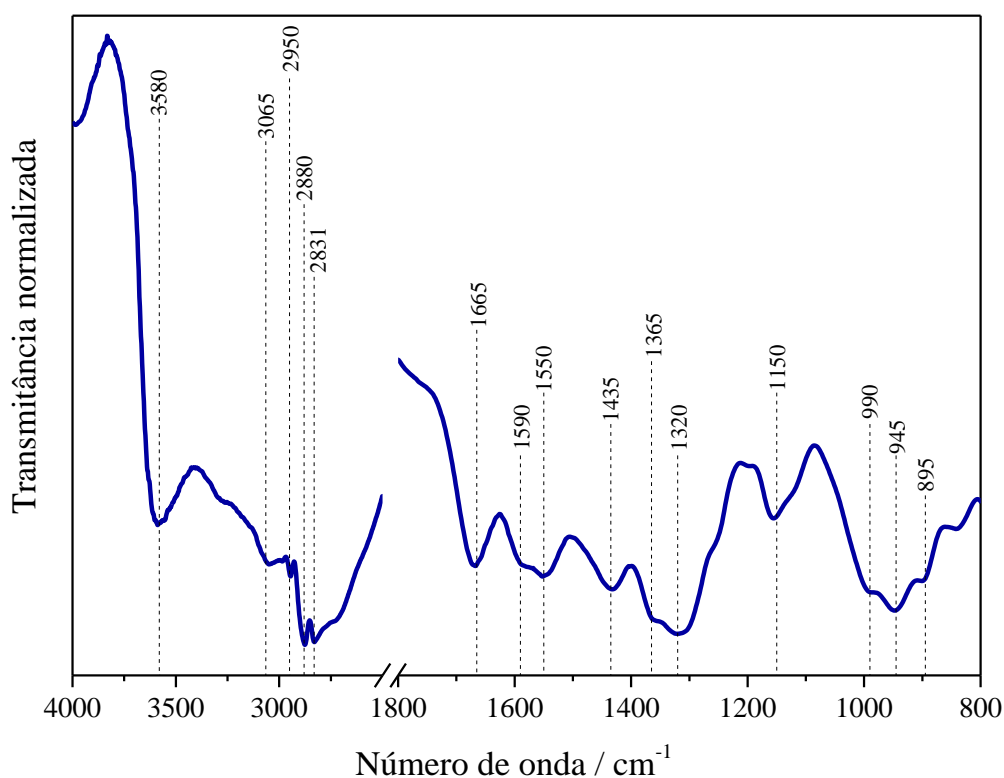


Figura 10 - Espectro de FTIR da quitosana de partida.

O grau de acetilação da quitosana pôde ser determinado através do uso de bandas específicas do espectro de FTIR da quitosana utilizadas como referência.⁶¹ Por exemplo, a razão entre a absorbância das bandas em 1655 cm^{-1} e em 3450 cm^{-1} (A_{1655}/A_{3450}) pode ser usada para estimar o grau de desacetilação do biopolímero já que se sabe que a razão entre

essas bandas é igual a 1,33 para uma amostra completamente acetilada (quitina) e igual a zero quando se trata de uma amostra totalmente desacetilada (quitosana).⁶² A absorvância de cada banda ($A_{1655} = 0,03$ e $A_{3450} = 0,11$) no FTIR registrado da quitosana foi medida de acordo com as linhas de base LB1 e LB2 mostradas na Figura 11^{61,62} e os valores foram substituídos na Equação 5, onde A_{1655} representa a absorvância da banda referente à amida I e A_{3450} representa a absorvância dos grupos $-OH$ da quitosana. O fator 1,33 é uma constante que representa a razão de A_{1655}/A_{3450} para uma amostra de quitina completamente acetilada. Através da substituição desses valores na Equação 1, o grau de acetilação foi estimado em 20,5%, que está na faixa de desacetilação indicada pelo fabricante de 75-85%.

O espectro de absorção da solução de quitosana utilizada nas preparações é mostrado na Figura 12 no qual é observada uma banda de absorção intensa com máximo em 250 nm e que se estende na região do violeta/azul, o que explica a coloração amarelada da mesma.

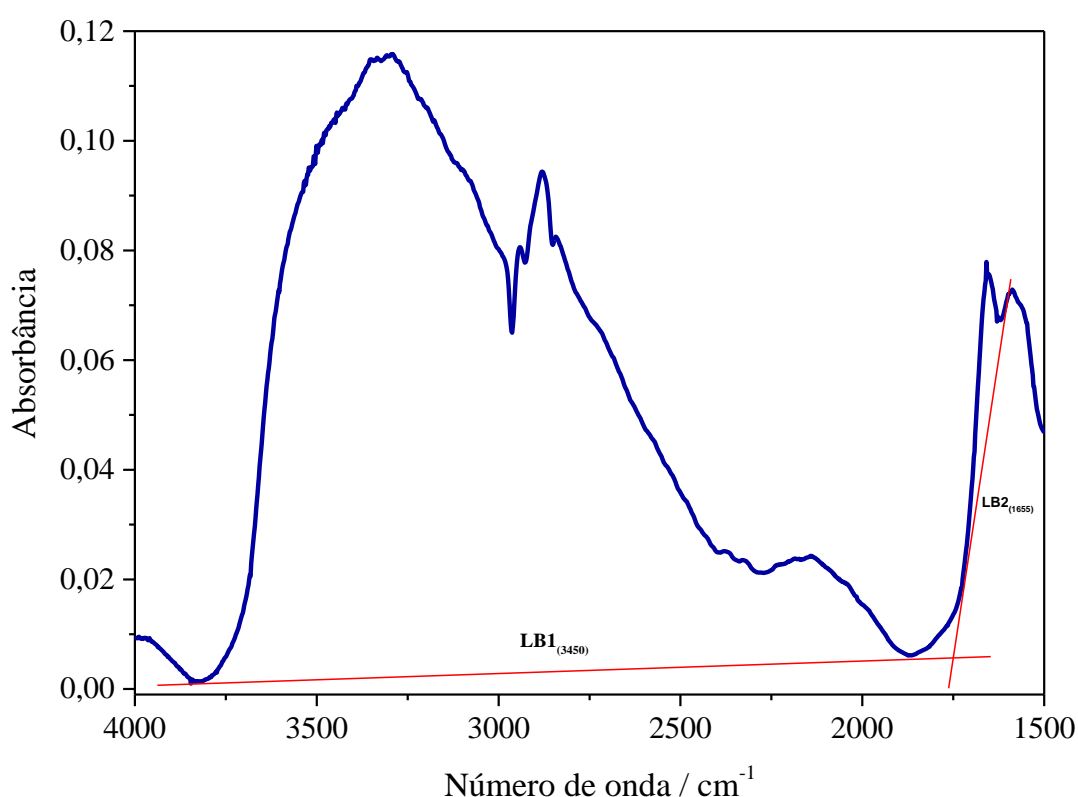


Figura 11 – Faixa espectral usada na determinação do grau de acetilação da quitosana com base na absorvância das bandas referentes aos estiramentos de O-H (3450 cm^{-1}) e carbonilas (1655 cm^{-1}). As linhas de base LB1 e LB2 foram utilizadas como referências para a determinação do valor da absorvância.

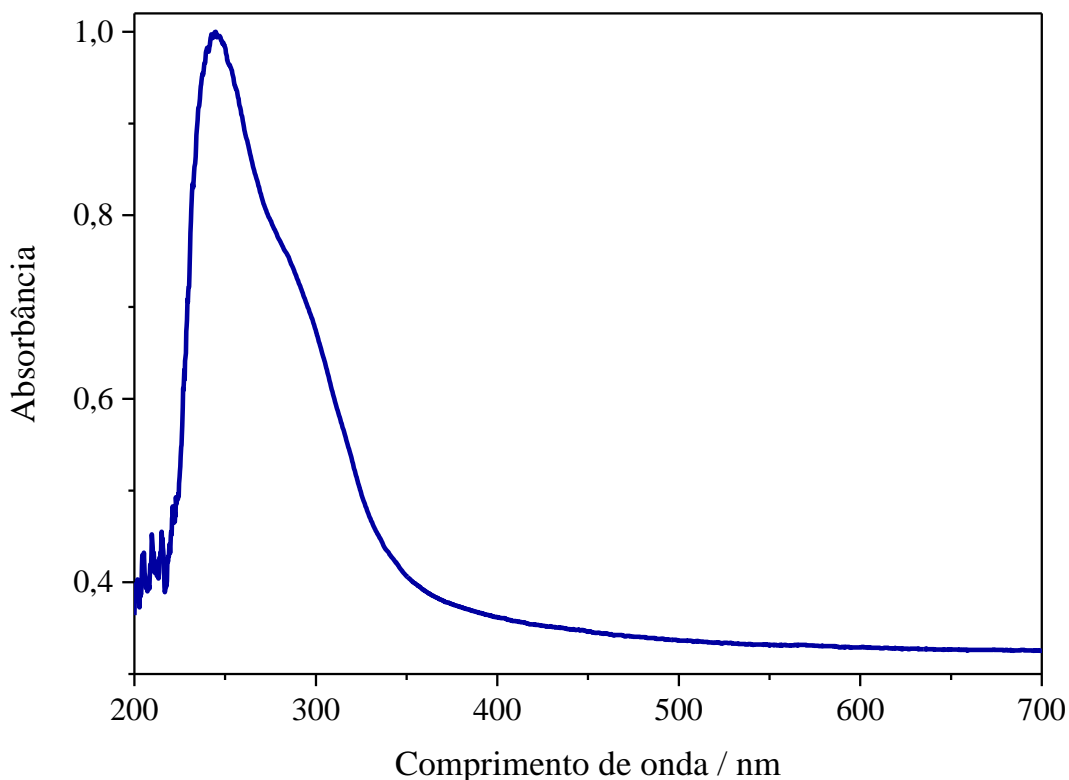


Figura 12 - Espectro eletrônico de absorção na região do UV-Vis da solução estoque de quitosana (1 % $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) em HAc (1% $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$).

A solução de quitosana 1% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) em HAc (1% $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$) foi analisada por potencial ζ e DLS para verificar a formação de aglomerados, tendo em vista que o fabricante só informa que o material tem baixo massa molar. O potencial ζ medido foi de $61,8 \pm 2,1$ mV, o que demonstra que as cadeias poliméricas encontram-se protonadas na solução. A distribuição de tamanho hidrodinâmico registrada é mostrada na Figura 13, onde se observa uma ampla distribuição de populações de vários tamanhos que indicam a presença de aglomerados de cadeias poliméricas.

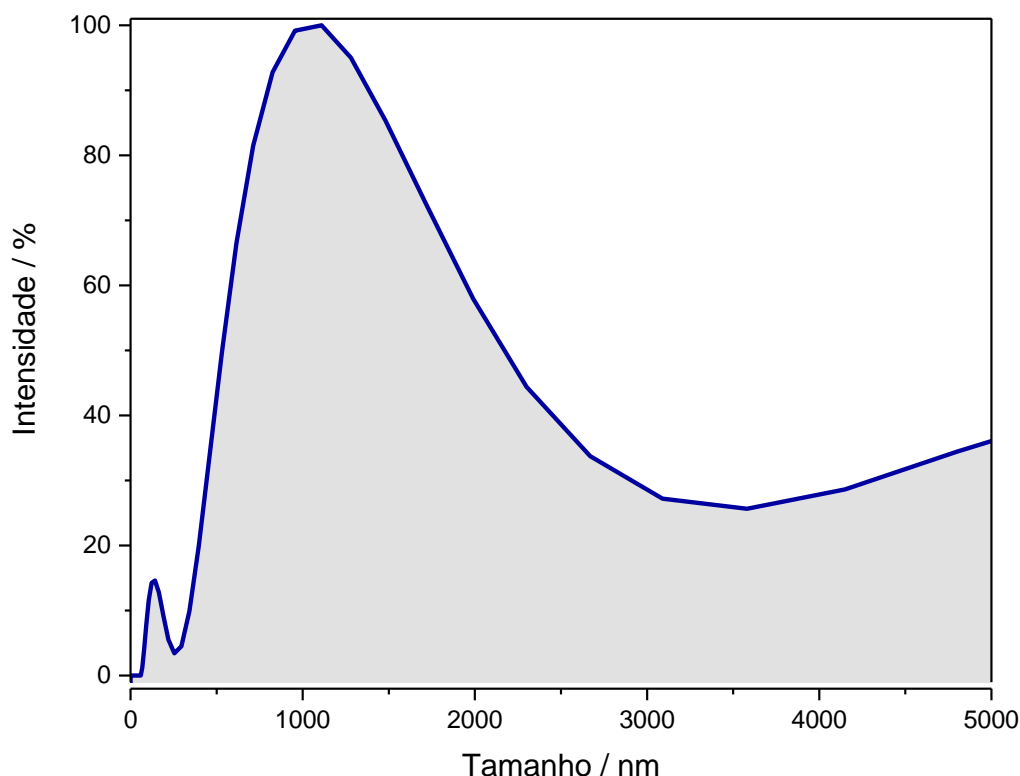


Figura 13 – Curva de distribuição do tamanho hidrodinâmico por DLS das partículas de quitosana na solução estoque 1 % $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$ em HAc (1% $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$).

4.2. Caracterização das Nanopartículas

4.2.1. Método da coacervação

O método de coacervação com EDTA não produziu os resultados desejados conforme o que era indicado no artigo utilizado como referência.⁵⁵ Segundo o procedimento a quitosana deveria ser dissolvida na solução EDTA. Embora tal método tenha sido utilizado em alguns trabalhos publicados,^{40,55,63} mas sem detalhes do procedimento experimental empregado, foi observado que a completa dissolução de EDTA em água só ocorre em pH 8,0, condição na qual quitosana torna-se insolúvel. Foi tentada a síntese tanto usando a solução de EDTA como no artigo seguido e a em pH 8,0. Ambos os procedimentos resultaram em formação massiva de precipitados, como mostrado na Figura 14, o que de fato não corresponde à formação de dispersões de nanopartículas. O DRX registrado deste material sólido isolado mostrou que ele é formado por uma mistura de EDTA e quitosana (Figura 15). Talvez nos artigos publicados

tenham sido utilizados o EDTA dissódico ou tetrassódico, mas essa informação não foi explicitada.



Figura 14 – Fotografias dos frascos contendo as dispersões formadas após a síntese por coacervação usando as proporções em massa de quitosana : EDTA de 3 : 1, 5 : 1 e 10:1.

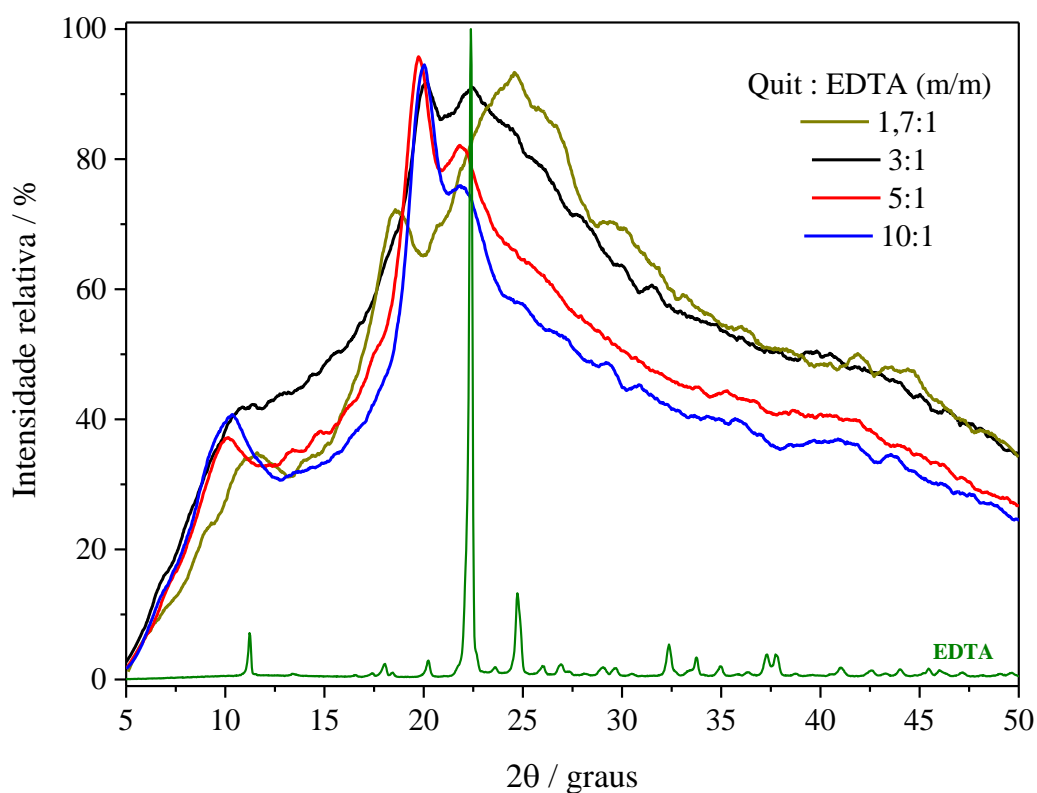


Figura 15 – Difratomogramas de raios X registrados dos precipitados isolados da síntese por coacervação com EDTA e do EDTA sólido, incluído para comparação.

Segundo o que foi reportado por Guo e colaboradores⁴⁰ o tamanho hidrodinâmico médio das nanopartículas formadas com as proporções quitosana:EDTA de 3:1, 5:1 e 10:1 foram, respectivamente, 227 nm, 181 nm e 122 nm. Claramente observa-se uma influência da quantidade de EDTA no tamanho hidrodinâmico da nanopartícula formada. Após separação do sólido depositado formado e analisando as dispersões remanescentes por DLS foi observado um comportamento parecido (Figura 16). Entretanto, foi observada também a presença de grandes agregados de nanopartículas.

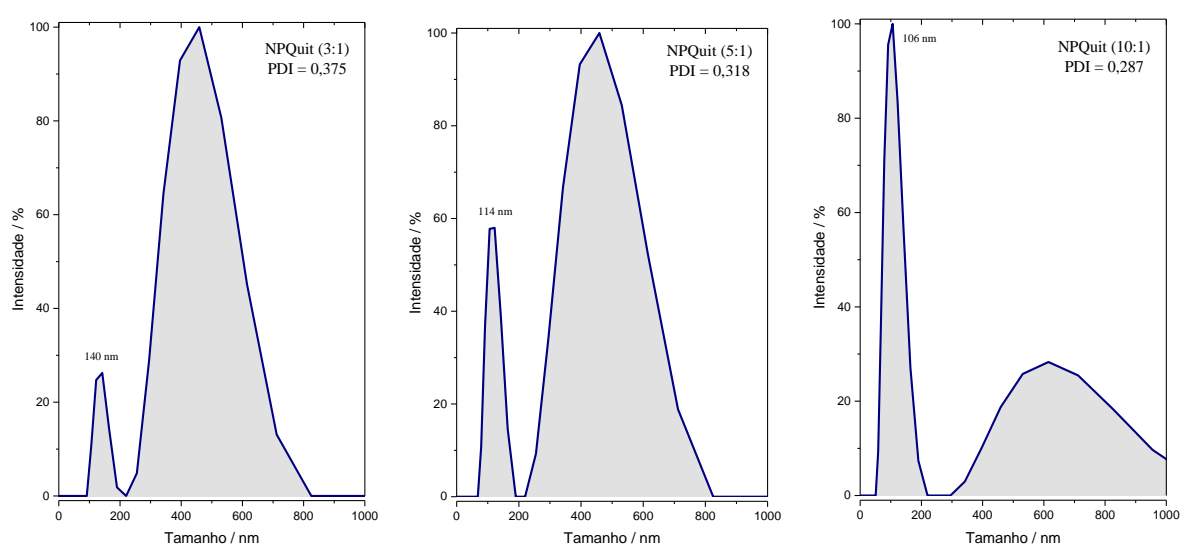


Figura 16 – Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana produzidas por coacervação registrada em função da intensidade da luz espalhada.

Os potenciais ζ dessas dispersões foram positivos e apresentaram valores crescentes em função da quantidade crescente de quitosana na mistura de partida (Figura 17). Os valores positivos indicam que a cadeia de quitosana se encontra protonada e que quanto mais positiva for a partícula, menor é seu tamanho hidrodinâmico. Esses dados indicam que parte do EDTA utilizado foi capaz de formar o complexo com a quitosana previamente ao processo de coacervação. Entretanto, devido a quantidade de material que permaneceu sedimentado e a pouca quantidade gerada de nanopartículas em dispersão após as sínteses, este método de síntese foi considerado não adequado para a produção dos nanocarreadores desejados.

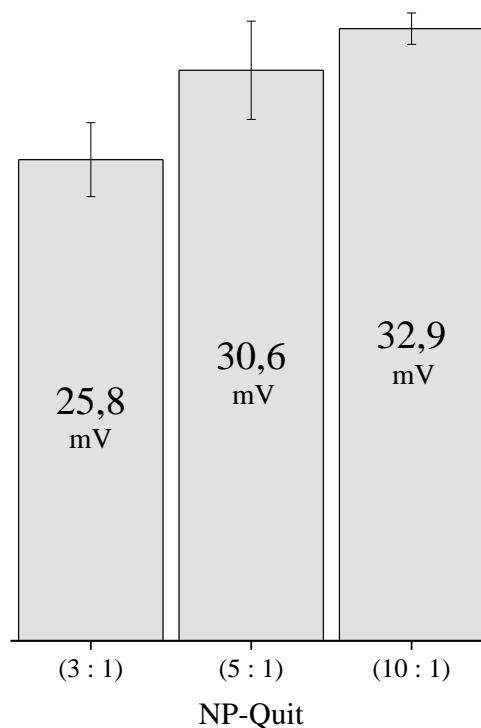


Figura 17 – Potencial ζ das nanopartículas de quitosana nas dispersões formadas após a síntese por coacervação nas diferentes proporções de quit:EDTA utilizadas.

4.2.2. Método da gelificação ionotrópica

Diferentemente do caso anterior, a síntese por gelificação ionotrópica produziu dispersões mais estáveis e com pouca presença de sólidos depositados ao final das sínteses como mostrado na Figura 18.

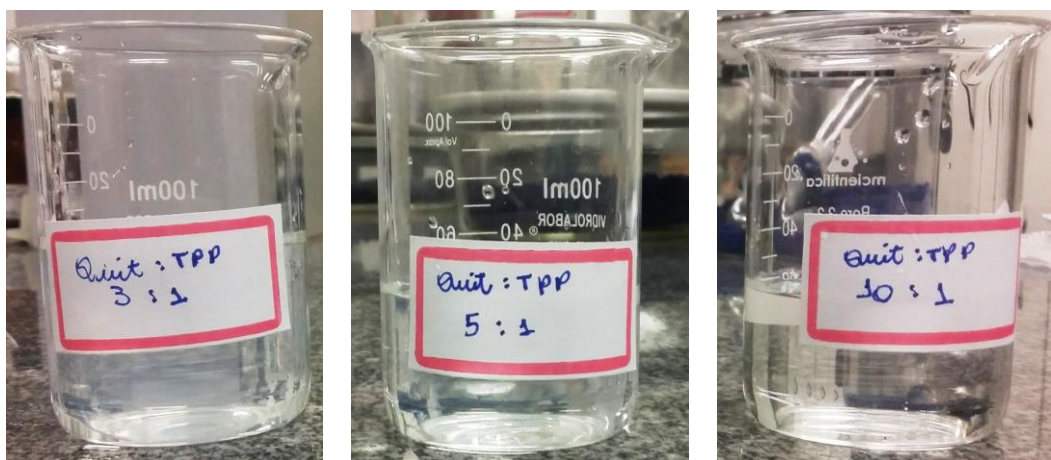


Figura 18 – Fotografias dos frascos contendo as dispersões formadas após a síntese por gelificação ionotrópica usando proporções em massa de quitosana:TPP de 3:1, 5:1 e 10:1.

Analisando os resultados de DLS das dispersões (Figura 19) é possível observar a presença de duas populações de partículas em todas as dispersões. Uma formada por nanopartículas e outra por agregados de partículas. Aparentemente, a quantidade de TPP adicionada ao meio reacional parece não afetar o tamanho das partículas formadas. Por outro lado, é observada uma tendência de aumento do tamanho dos agregados com o aumento da proporção em massa de quitosana no meio reacional. No estudo publicado por Tripathy e colaboradores⁴⁵ usado como referência, o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas em dispersões altamente diluídas variou entre 150 – 225 nm. Devido à grande diluição, aparentemente, os autores não observaram a formação de agregados como os mostrados na Figura 19. Embora os autores também tenham variado a proporção em massa de quitosana : TPP, nenhuma informação foi dada em relação ao efeito do TPP no tamanho hidrodinâmico ou no potencial ζ das nanopartículas formadas. Considerando o índice de polidispersividade das dispersões, a que foi preparada na proporção de 3:1 foi a que apresentou o melhor valor e por essa razão foi a que foi utilizada nos estudos posteriores de liberação de fármacos.

Com relação ao potencial ζ medido foram observados valores positivos em todas as dispersões (Figura 20), indicando que a quitosana encontra-se com seus grupos amino protonados. O valor do potencial aumenta a medida que menos TPP é utilizado, o que confirma o mecanismo de interação eletrostática na formação das nanopartículas.

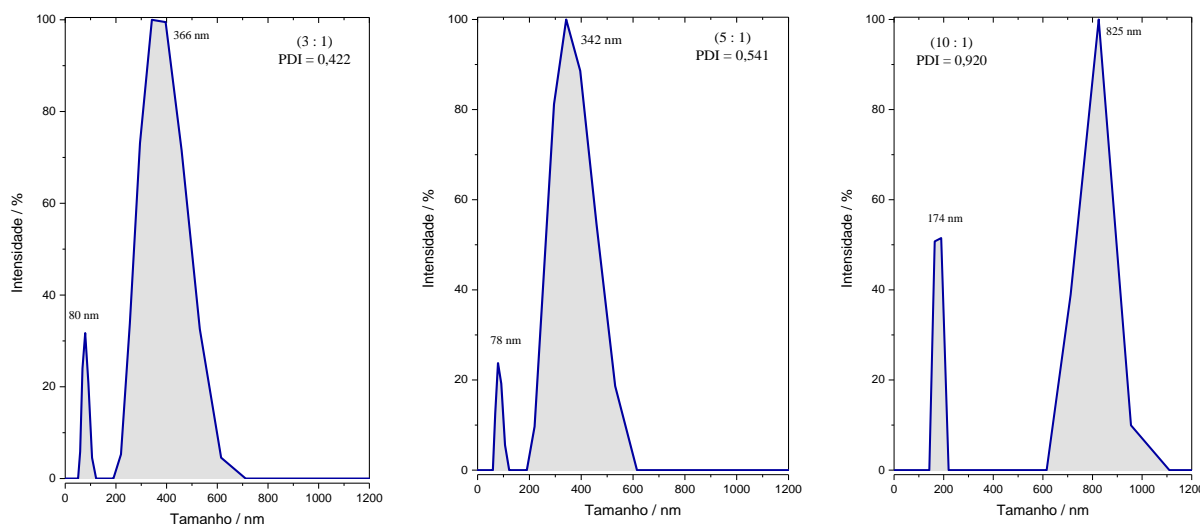


Figura 19 - Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana produzidas por gelificação ionotrópica registrada em função da intensidade da luz espalhada.

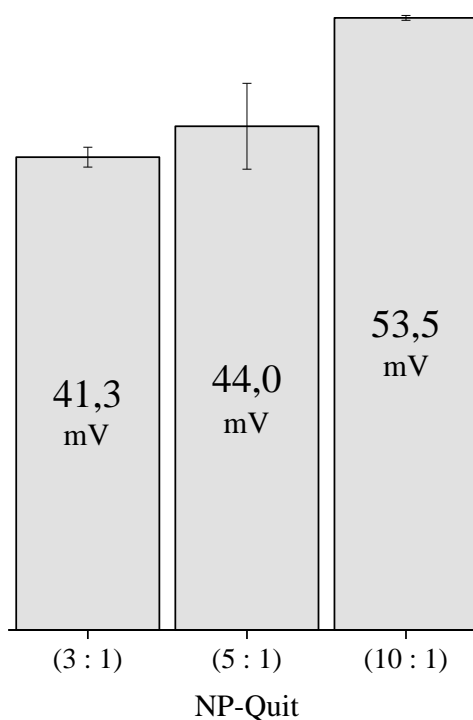


Figura 20 - Potencial ζ das nanopartículas de quitosana nas dispersões formadas após a síntese por gelificação ionotrópica nas diferentes proporções em massa de quitosana : TPP utilizadas.

O difratograma de raios X das nanopartículas isoladas da dispersão produzida pela razão de massa quitosana:TPP de 3:1 (Figura 21) apresentou um padrão de difração distinto da quitosana pura (Figura 9). A NP-quit (3:1) apresentou um halo amorfo mais proeminente com três picos de baixa intensidade que apareceram em posições diferentes ($2\theta = 11^\circ$, $18,5^\circ$ e

24,5°) das observadas para os picos da quitosana pura ($2\theta = 10,2^\circ$ e $20,3^\circ$). Comparando o difratograma da nanopartícula de quitosana com o registrado do tripolifosfato de sódio (TPP) (Figura 21) não é possível fazer uma correlação direta dos picos da nanopartícula com a existência de partículas de TPP cristalizadas no material.

A presença do TPP nas nanopartículas de quitosana é verificada no espectro de FTIR (Figura 22) pelo aparecimento das bandas 1209 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{P}=\text{O}$, 1165 cm^{-1} referentes às vibrações de estiramento simétricas e antissimétricas do grupo PO_2 , 1076 cm^{-1} referente aos estiramentos simétricos e antissimétricos do grupo PO_3 e em 885 cm^{-1} referente à deformação angular do grupo $\text{P}-\text{O}-\text{P}$.⁶⁴

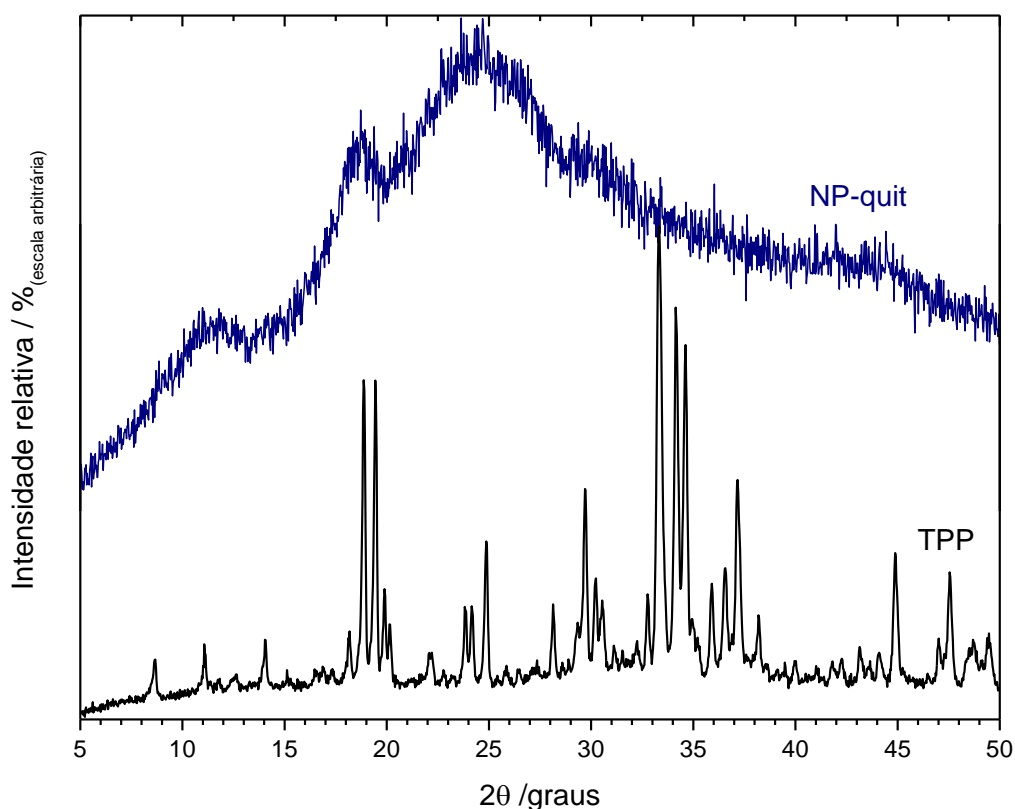


Figura 21 – Difratogramas de raios X da nanopartícula produzida usando a proporção em massa quitosana: TPP de 3 :1 (NP-quit) e do tripolifosfato de sódio (TPP).

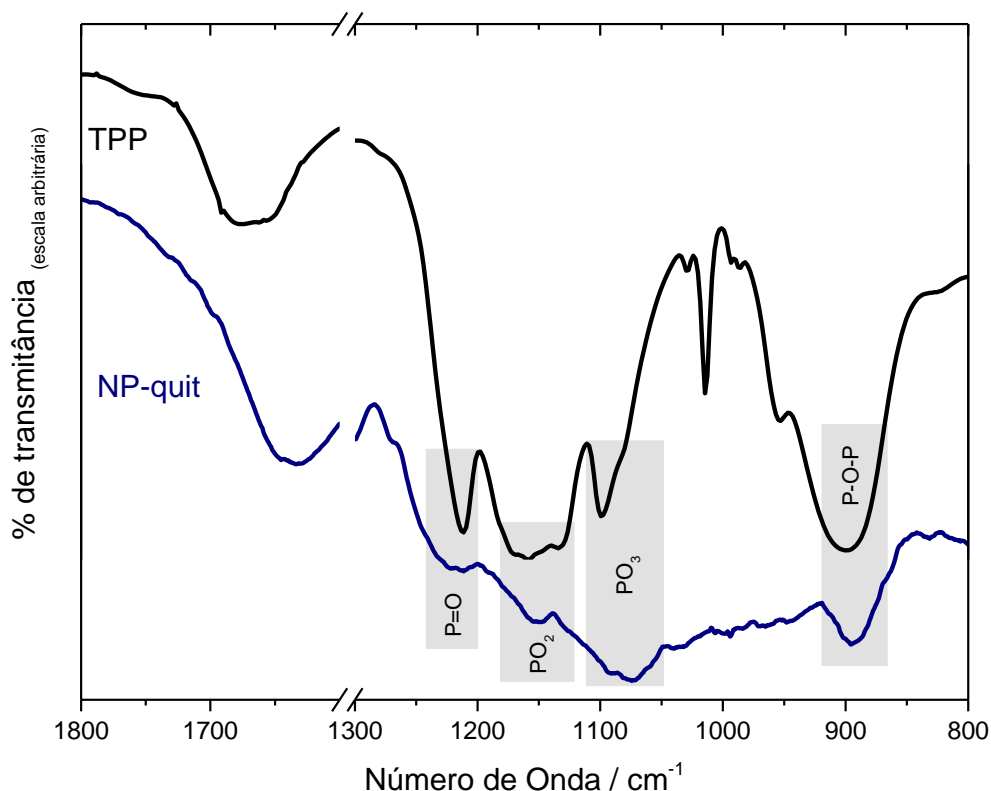


Figura 22 – Espectro de FTIR da nanopartícula produzida usando a proporção em massa quitosana : TPP de 3 : 1 (NP-quit) e do tripolifosfato de sódio (TPP).

4.3. Incorporação do ibuprofeno nas nanopartículas e ensaios de liberação.

Considerando o espectro de absorção da solução inicial de ibuprofeno (5 mL) contendo 7,5 mg do fármaco e 9 mg de TPP e após da solução final após o processo de síntese das nanopartículas (Figura 23) é possível considerar que quase todo o ibuprofeno foi incorporado nas nanopartículas. A absorbância máxima da solução após a reação foi de 0,06, o que representa cerca de 0,67 mg do fármaco ainda em solução. Portanto, foi incorporado cerca de 6,8 mg de ibuprofeno nas nanopartículas, o que corresponde a uma eficiência de incorporação de 91 % e resulta em um carreador contendo cerca de 22 % em massa do fármaco. Com a incorporação do ibuprofeno o potencial ζ reduziu de +41,3 mV para +13,1 mV, diminuindo a estabilidade coloidal e aumentando a agregação entre as nanopartículas, como observado no DLS registrado (Figura 24).

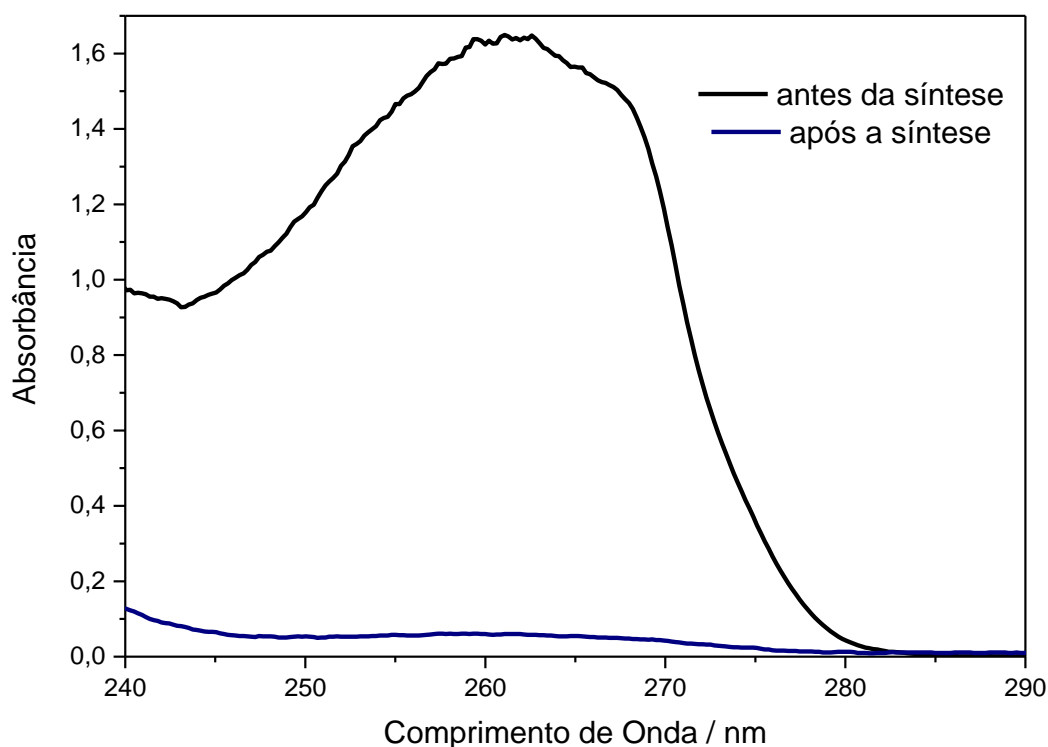


Figura 23 – Espectros eletrônicos de absorção no UV da solução antes e após a incorporação do ibuprofeno nas nanopartículas de quitosana.

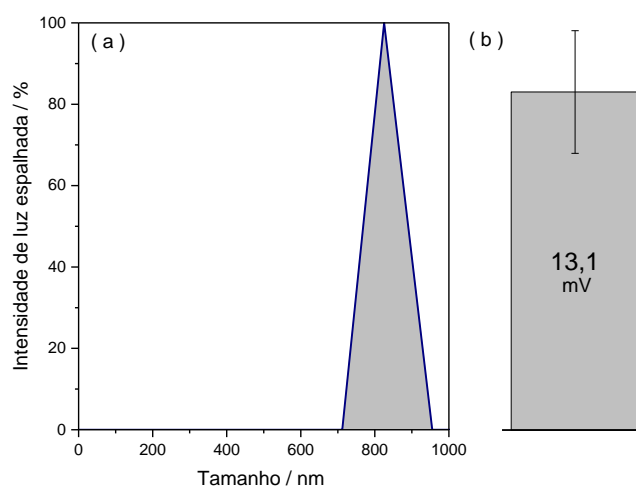


Figura 24 – (a) Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana com ibuprofeno incorporado (Ibu@NP-quit) e (b) potencial ζ medido na dispersão de Ibu@NP-quit.

O difratograma de raios X registrado do material isolado das dispersões (Figura 25) apresenta, além do halo do material polimérico, picos estreitos característicos da presença de material cristalino. Como discutido anteriormente, o TPP presente nas nanopartículas não

produziu esse padrão de difração, que neste caso pode ser atribuído à presença de ibuprofeno cristalizado no material (Figura 25).

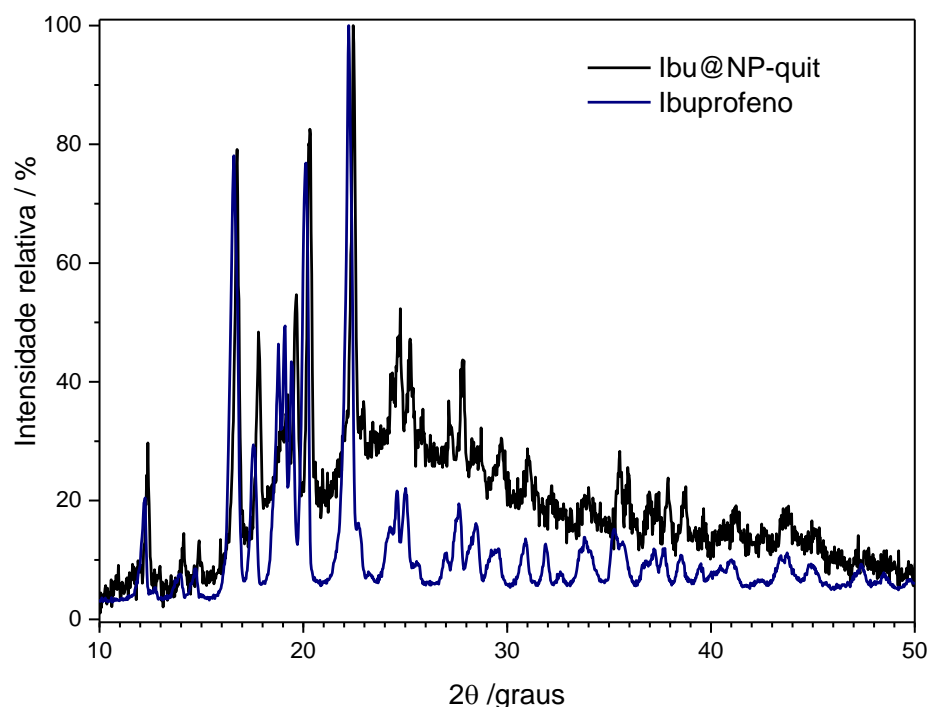


Figura 25 – Difrátogramas de raios X das nanopartículas de quitosana após a incorporação de ibuprofeno (Ibu@NP-quit) e do ibuprofeno sólido.

Bandas referentes à modos vibracionais do ibuprofeno cristalino também são observadas no espectro de FTIR das nanopartículas (Figura 26). Na estrutura cristalina do ibuprofeno são encontrados dímeros ligados por ligações de hidrogênio, onde o estiramento C=O é observado em 1721 cm^{-1} .⁶⁵ Na região destacada em cinza na Figura 26 essa banda está aparecendo em 1718 cm^{-1} . Entretanto, no espectro da nanopartícula de quitosana, uma banda adicional está presente em 1645 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída à presença do ibuprofeno na forma de carboxilato, o que pode ser explicado pelas moléculas do fármaco que estão interagindo com os grupos amino da estrutura da quitosana.

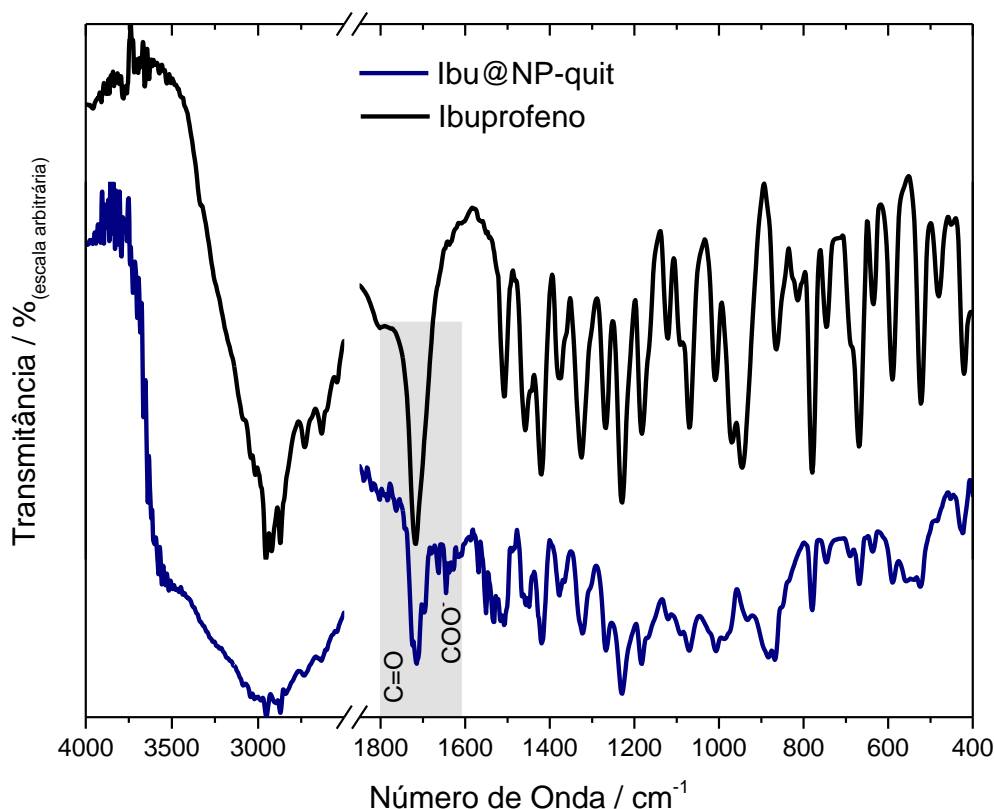


Figura 26 – Espectros de FTIR das nanopartículas de quitosana após a incorporação de ibuprofeno (Ibu@NP-quit) e do ibuprofeno sólido.

Além das bandas da carbonila e carboxilatos, o ibuprofeno apresenta como bandas características uma em 1530 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações C=C do anel aromático e 1420 cm^{-1} referente à deformação angular de -C-H adjacentes a carbonila. As bandas do TPP também são observadas em 1220 cm^{-1} atribuída ao estiramento P=O. Bandas da quitosana aparecem em 1658 cm^{-1} atribuída ao C=O de amidas; 1580 cm^{-1} atribuída ao N—H de aminas secundárias, 1324 cm^{-1} referente ao estiramento C—N de aminas e 900 cm^{-1} à deformação C—O—C.⁶⁴

4.3.1. Ensaios de Liberação

Para verificar o efeito da incorporação do ibuprofeno na NP-quit, a liberação do fármaco foi analisada em diferentes meios. A Figura 27 mostra a porcentagem de ibuprofeno liberada das NP-quit ao longo do tempo em tampão fosfato com pH 6,0 e 8,0. Em ambas condições foi observada uma liberação inicial abrupta, que pode ocorrer em razão das rápida

liberação das moléculas de ibuprofeno que se encontram mais na superfície da nanopartícula ou quando cristais segregados do fármaco estão presentes e se dissolvem no meio. Entretanto, essa liberação inicial foi mais pronunciada em pH 6,0 do que em pH 8,0, mesmo com a menor solubilidade do ibuprofeno em meio ácido, o que leva a crer que essa liberação está relacionada também com a quitosana.

Uma porcentagem parecida de ibuprofeno liberado em meio ácido (pH = 5,6) foi observada em membranas de quitosana.⁶⁶ Segundo os autores, a liberação acontece em dois estágios:⁶⁶ o inicial ao longo das 5 h iniciais, onde ocorre a liberação rápida do ibuprofeno mais superficial (*efeito burst*) obedecendo uma cinética de primeira ordem; e o segundo estágio, mais lento, que corresponde à liberação do ibuprofeno que encontra-se interno a matriz polimérica, cujo processo é controlado pela difusão e influenciado pelo intumescimento da matriz polimérica no meio aquoso.

Após 180 min, 30 % do ibuprofeno incorporado à nanopartícula foi liberado em pH 6,0, enquanto que apenas 13 % se esvaiu em pH 8,0. Uma quantidade semelhante de ibuprofeno liberado da observada neste estudo em pH 6,0 ocorreu em tampão fosfato pH 7,4 para microesferas de quitosana produzidas por reticulação com glutaraldeído e por gelificação ionotrópica⁶⁷ e em nanocápsulas.⁶⁸ Claramente, a incorporação do fármaco nas nanopartículas altera a disponibilidade do ibuprofeno. Para efeito de comparação, a dissolução do ibuprofeno a partir de comprimidos, em geral, não leva mais do que 5 min para ser completa em tampão fosfato com pH 7,4, que é a condição padrão normatizada para ensaios de liberação.⁶⁹

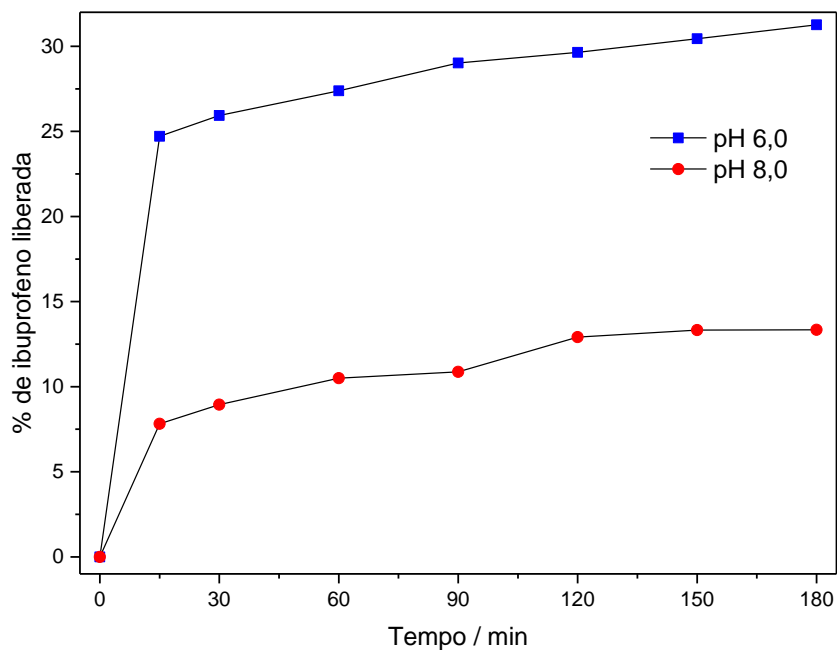


Figura 27 – Curvas de liberação cumulativa do ibuprofeno incorporado em NP-quit em pH 6,0 e 8,0.

A liberação do ibuprofeno em FCS (Figura 28), que é um meio tamponado (pH 7,2) e com sais que mimetizam a composição das condições fisiológicas do meio celular, ocorreu de forma similar a observada em tampão com pH 6,0 discutida anteriormente.

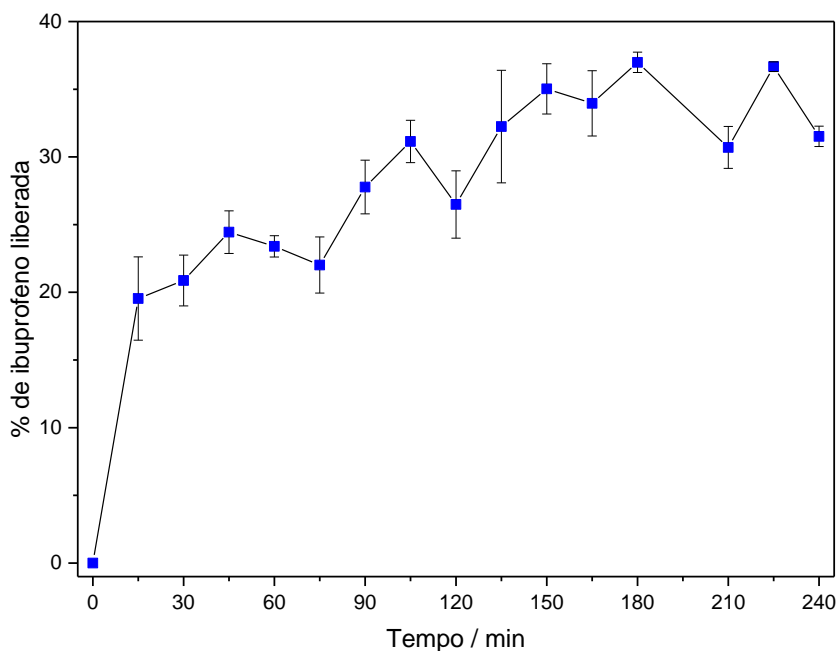


Figura 28 - Curva de liberação cumulativa do ibuprofeno incorporado em NP-quit em FCS (pH 7,2).

Os modelos cinéticos de liberação de ordem zero, Korsmeyer-Peppas e Hixson-Crowell, descritos anteriormente, foram aplicados a curva experimental de liberação em FCS. Entretanto, os pontos coletados com 75, 120, 210 e 240 min não foram considerados no ajuste da reta por regressão linear por estarem nitidamente fora da tendência experimental devido a algum problema ocorrido durante o registro do valor da absorbância máxima da alíquota retirada nesses intervalos de tempo.

Os dados experimentais não se ajustaram ao modelo de liberação de ordem zero, esperado para o caso da dissolução lenta de fármacos a partir de formas farmacêuticas que não desagregam.⁶⁸ O coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,71898 indica um ajuste pouco linear aos dados experimentais de liberação, como mostrado na Figura 29. O mesmo ocorreu para o modelo Hixson-Crowell, o qual é aplicado a formas farmacêuticas que não desagregam como matrizes porosas.⁶⁸ O coeficiente R^2 usando esse modelo foi de 0,76414, como mostrado na Figura 30.

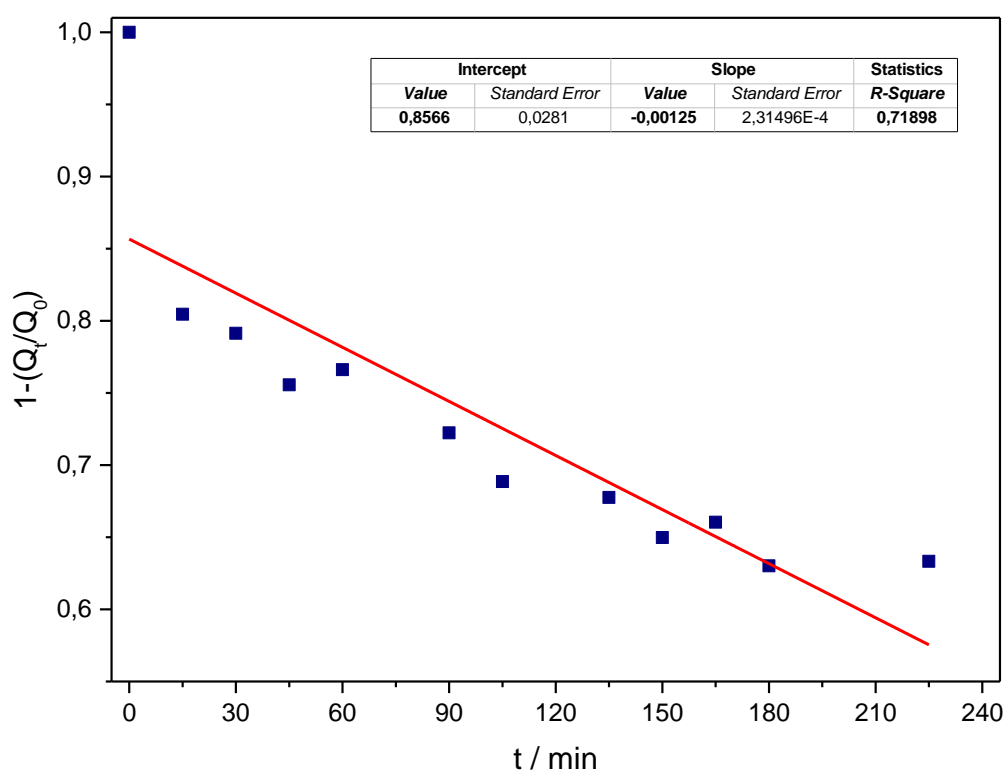


Figura 29 – Reta obtida por regressão linear dos dados experimentais da liberação do ibuprofeno em FCS segundo o modelo cinético de liberação de ordem zero.

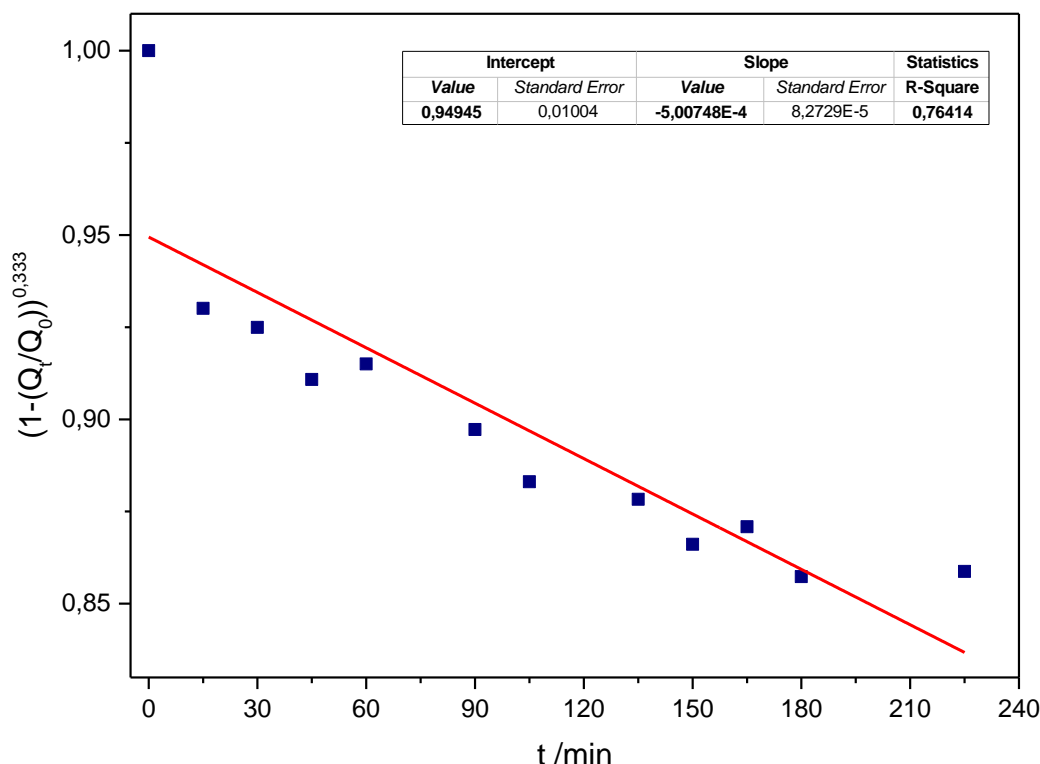


Figura 30 - Retas obtidas por regressão linear dos dados experimentais da liberação do ibuprofeno em FCS segundo o modelo cinético de liberação de Hixson-Crowell.

Uma correlação linear de 0,93982 foi conseguida quando o modelo de Korsmeyer-Peppas foi aplicado, como mostrado na Figura 31. Este modelo é indicado para descrever a liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas poliméricas,⁶⁸ como no caso deste estudo. O expoente n de 0,26474 indica que o mecanismo é dominado pela difusão do fármaco através da matriz polimérica (vide Tabela 3). Espera-se, nesse caso, uma liberação inicial rápida devido ao efeito *burst* referente à difusão do fármaco localizado mais próximo da superfície da nanopartícula e um segundo processo, mais lento, que envolve a difusão do fármaco presente no interior da matriz polimérica. Entretanto, devido o valor do expoente n encontrado, apenas o processo inicial foi observado no período em que a liberação foi monitorada. Quando os dois processos são monitorados espera-se a obtenção de coeficientes maiores do que 1,00, como reportado para a liberação de ibuprofeno a partir de microesferas de quitosana.⁶⁷

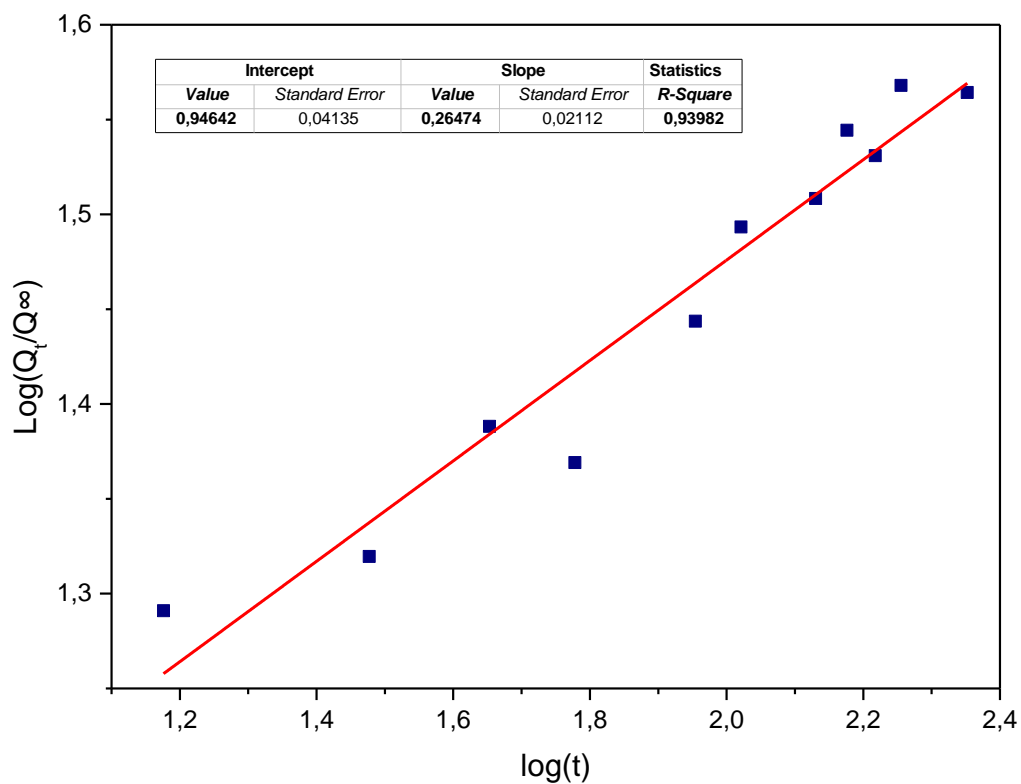


Figura 31 - Reta obtida por regressão linear dos dados experimentais da liberação do ibuprofeno em FCS segundo o modelo cinético de liberação de Korsmeyer-Peppas.

5. CONCLUSÕES

Os métodos de síntese por gelificação ionotrópica usando tripolifosfato de sódio e de coacervação usando o ácido etilenodiamino tetra-acético foram empregados para a síntese de nanopartículas de quitosana, sintetizadas por dois métodos. O método de gelificação ionotrópica, na proporção em massa de quitosana e TPP de 3 : 1, foi o mais eficaz para a formação de uma dispersão estável de nanopartículas, tendo como os critérios de seleção o tamanho hidrodinâmico, o valor do potencial ζ e o índice de polidispersividade. O método da coacervação não apresentou os resultados descritos nos artigos consultados para a execução das sínteses. Possivelmente, devido a nos procedimentos reportados não ter sido utilizado o EDTA não na forma do ácido tetra-acético.

A incorporação do ibuprofeno foi realizada de maneira direta durante a formação das nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação. A eficiência do processo de incorporação do ibuprofeno foi de 91 %, resultando em um carreador contendo 22% da massa referente ao fármaco. Com a incorporação do ibuprofeno o potencial ζ reduziu de +41 mV para +13 mV, o que resultou em dispersões com menor estabilidade coloidal e tendência à agregação das nanopartículas.

A quantidade de ibuprofeno liberado após a incorporação nas nanopartículas de quitosana foi maior em meio ácido (tampão fosfato pH 6,0) do que meio alcalino (tampão fosfato pH 8,0), apresentando uma tendência oposta ao que se espera da solubilidade do fármaco. Em fluido corporal simulado (pH 7,2) a liberação foi semelhante à observada em meio ácido com uma cinética que se ajustou ao modelo de liberação de Korsmeyer-Peppas descrito para matrizes poliméricas. O expoente da lei de velocidade determinado indica que o mecanismo é dominado pela difusão do fármaco localizado mais próximo da superfície da partícula através da matriz polimérica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Breuer, E.; Chorghade, M. S.; Fischer, J.; Golomb, G. Glossary of Terms Related to Pharmaceutics (IUPAC Recommendations 2009). *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81* (5), 971–999.
- (2) Stein, A.; Melde, B. J.; Schroden, R. C. Hybrid Inorganic - Organic Mesoporous Silicates - Nanoscopic Reactors Coming of Age. *Adv. Mater.* **2000**, *12* (19), 1403–1419.
- (3) Merisko-Liversidge, E.; Liversidge, G. G. Nanosizing for Oral and Parenteral Drug Delivery: A Perspective on Formulating Poorly-Water Soluble Compounds Using Wet Media Milling Technology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *63* (6), 427–440.
- (4) Gao, L.; Liu, G.; Ma, J.; Wang, X.; Zhou, L.; Li, X. Drug Nanocrystals: In Vivo Performances. *J. Control. release* **2012**, *160* (3), 418–430.
- (5) Lee, J. H.; Yeo, Y. Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *125*, 75–84.
- (6) Sun, Q.; Radosz, M.; Shen, Y. Challenges in Design of Translational Nanocarriers. *J. Control. Release* **2012**, *164* (2), 156–169.
- (7) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 36–48.
- (8) Lehr, C.-M.; Bouwstra, J. A.; Schacht, E. H.; Junginger, H. E. In Vitro Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan and Some Other Natural Polymers. *Int. J. Pharm.* **1992**, *78* (1–3), 43–48.
- (9) Sogias, I. A.; Williams, A. C.; Khutoryanskiy, V. V. Why Is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules* **2008**, *9* (7), 1837–1842.
- (10) Mansuri, S.; Kesharwani, P.; Jain, K.; Tekade, R. K.; Jain, N. K. Mucoadhesion: A Promising Approach in Drug Delivery System. *React. Funct. Polym.* **2016**, *100*, 151–172.
- (11) Liu T.; Yang, Y.; Shen, H. P.; Gao, S. Q.; W. Facilitate and Simple Preparation of PH-Sensitive Chitosan-Mesoporous Silica Nanoparticle for Future Breast Cancer Treatment. *Express Polym Lett* **2015**, *9*, 1068–1075.
- (12) Yeul, V. S.; Rayalu, S. S. Unprecedented Chitin and Chitosan: A Chemical Overview. *J. Polym. Environ.* **2013**, *21* (2), 606–614.
- (13) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (7), 603–632.

- (14) Laranjeira, M. C. M.; de Fávere, V. T. Quitosana; Biopolímeros Funcional Com Potencial Industrial Biomédico . *Quim. Nova* **2009**, 32 (3), 672–678.
- (15) Naito, P.-K.; Ogawa, Y.; Sawada, D.; Nishiyama, Y.; Iwata, T.; Wada, M. X-Ray Crystal Structure of Anhydrous Chitosan at Atomic Resolution. *Biopolymers* **2016**, 105 (7), 361–368.
- (16) Mendes, A. A.; Oliveira, P. C. de; Castro, H. F. de; Giordano, R. Aplicação de Quitosana Como Suporte Para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial. *Quim. Nova* **2011**, 34 (5), 831–840.
- (17) Islam, S.; Bhuiyan, M. A. R.; Islam, M. N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *J. Polym. Environ.* **2017**, 25 (3), 854–866.
- (18) Rabea, E. I.; Badawy, M. E.-T.; Stevens, C. V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules* **2003**, 4 (6), 1457–1465.
- (19) Chung, Y.-C.; Chen, C.-Y. Antibacterial Characteristics and Activity of Acid-Soluble Chitosan. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99 (8), 2806–2814.
- (20) Kim, H.; Tator, C. H.; Shoichet, M. S. Chitosan Implants in the Rat Spinal Cord: Biocompatibility and Biodegradation. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, 97A (4), 395–404.
- (21) VandeVord, P. J.; Matthew, H. W. T.; DeSilva, S. P.; Mayton, L.; Wu, B.; Wooley, P. H. Evaluation of the Biocompatibility of a Chitosan Scaffold in Mice. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 59 (3), 585–590.
- (22) Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E.; Dash F.; Ottenbrite, R.; Chiellini, E., M.; Chiellini. Chitosan a Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, 36 (8), 981–1014.
- (23) Wongpreecha, J.; Polpanich, D.; Suteewong, T.; Kaewsaneha, C.; Tangboriboonrat, P. One-Pot, Large-Scale Green Synthesis of Silver Nanoparticles-Chitosan with Enhanced Antibacterial Activity and Low Cytotoxicity. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 199, 641–648.
- (24) Tavaría, F. K.; Costa, E. M.; Pina-Vaz, I.; Carvalho, M. F.; Pintado, M. M. A Quitosana Como Biomaterial Odontológico: Estado Da Arte. *Rev. Bras. Eng. Biom* **2013**, 29 (1), 110–120.
- (25) Tavares, I. S. Obtenção e Caracterização de Nanopartículas de Quitosana, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.
- (26) Villanova, J. C. O.; Oréfice, R. L.; Cunha, A. S. Aplicações Farmacêuticas de

- Polímeros. *Polímeros Ciência e Tecnol.* **2010**, 20 (1), 51–64.
- (27) Carvalho, F. C.; Chorilli, M.; Gremião, M. P. D. Nanotechnology-Based Polymeric Bio (Muco) Adhesive Platforms for Controlling Drug Delivery-Properties, Methodologies and Applications. *Polímeros* **2014**, 24 (2), 203–213.
- (28) M Ways, T. M.; Lau, W. M.; Khutoryanskiy, V. V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)*. **2018**, 10 (3), 267.
- (29) Sogias, I. A.; Williams, A. C.; Khutoryanskiy, V. V; Sogias I.;Williams, C, A.;Khutoryanski, V, V., A.; Sogias, I. A.; Williams, A. C.; Khutoryanskiy, V. V. Chitosan-Based Mucoadhesive Tablets for Oral Delivery of Ibuprofen. *Int. J. Pharm.* **2012**, 436 (1–2), 602–610.
- (30) Maia, J. L. Desenvolvimento de Microcápsulas Contendo as Antocianinas Presentes No Corante Do Extrato Do Jambo Por Polimerização Interfacial. Universidade Federal do Rio Grande do Norte 2013.
- (31) Davi M., C. P. F. *Química Supramolecular e Nanotecnologia*; 2014.
- (32) Toledo, A. M. N.; Soares, L. A. S. Bionanopartículas: Principais Aspectos E Aplicações Da Matéria Orgânica Em Escala Nanométrica. *HOLOS* **2016**, 1, 340–349.
- (33) Busilacchi, A.; Gigante, A.; Mattioli-Belmonte, M.; Manzotti, S.; Muzzarelli, R. A. A. Chitosan Stabilizes Platelet Growth Factors and Modulates Stem Cell Differentiation toward Tissue Regeneration. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 98 (1), 665–676.
- (34) Devlin, J. J.; Kircher, S.; Kozen, B. G.; Littlejohn, L. F.; Johnson, A. S. Comparison of ChitoFlex®, CELOX™, and QuikClot® in Control of Hemorrhage. *J. Emerg. Med.* **2009**.
- (35) Silva, V. C. Avaliação Do Método de Obtenção de Scaffolds Quitosana/Curcumina Sobre a Estrutura, Morfologia e Propriedades Térmicas. *Rev. Matéria* **2016**, 21 (3), 560–568.
- (36) Dong, Y.; Liang, J.; Cui, Y.; Xu, S.; Zhao, N. Fabrication of Novel Bioactive Hydroxyapatite-Chitosan-Silica Hybrid Scaffolds: Combined the Sol-Gel Method with 3D Plotting Technique. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 197, 183–193.
- (37) Dimer, F. A.; Friedrich, R. B.; Beck, R. C. R.; Guterres, S.; Pohlmann, A. R. Impactos Da Nanotecnologia Na Saúde: Produção de Medicamentos. *Química nova. São Paulo Soc. Bras. Química, 1978-. Vol. 36, n. 10,(2013), p. 1520-1526* **2013**.
- (38) Shi, M.; Lu, J.; Shoichet, M. S. Organic Nanoscale Drug Carriers Coupled with Ligands for Targeted Drug Delivery in Cancer. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19 (31), 5485–

- 5498.
- (39) Jonassen, H.; Kjøniksen, A.; Hiorth, M. Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (11), 3747–3756.
 - (40) Guo, R.; Zhang, L.; Qian, H.; Li, R.; Jiang, X.; Liu, B. Multifunctional Nanocarriers for Cell Imaging, Drug Delivery, and Near-IR Photothermal Therapy. *Langmuir* **2010**, *26* (8), 5428–5434.
 - (41) Vallet-Regi, M.; Ramila, A.; Del Real, R. P.; PÃ©rez-Pariente, J.; Perez-Pariente, J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (2), 308–311.
 - (42) Lima, L. A. Nanopart culas de Quitosana/Tripolifosfato de S dio Obtidas via Gelatiniza  o I nica Para a Nanoencapsula  o de Quercetina. **2014**.
 - (43) Vasconcelos, C. L. de. Obten  o de Dispers  es de Complexos Polieletr l ticos a Base de Quitosana e Poli ( cido Metacr lico) e An lise de Adsor   o de Albumina Bovina S rica. **2007**.
 - (44) Desai G., K.; Desai, K. G. Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances. *Pub Med Journals* **2016**, *33* (2), 107–158.
 - (45) Tripathy, S.; Das, S.; Prasad, S.; Kumar, S.; Pramanik, P.; Roy, S. Synthesis , Characterization of Chitosan – Tripolyphosphate Conjugated Chloroquine Nanoparticle and Its in Vivo Anti-Malarial Efficacy against Rodent Parasite : A Dose and Duration Dependent Approach. *Int. J. Pharm.* **2012**, *434* (1–2), 292–305.
 - (46) Tsai, M. L.; Bai, S. W.; Chen, R. H. Cavitation Effects versus Stretch Effects Resulted in Different Size and Polydispersity of Ionotropic Gelation Chitosanan Sodium Tripolyphosphate Nanoparticle. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *71* (3), 448–457.
 - (47) Saloma, M.; Tervasma, P.; Areva, S.; Kankare, J.; Salomaki, M.; Areva, S.; Kankare, J.; Salomaki Sami; Kankare, Jouko, M. A. The Hofmeister Anion Effect and the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2004**, *20* (9), 3679–3683.
 - (48) Liu, W.; He, G.; Qian, Z. Preparation of Chitosan Nanocapsules and Their Release Properties. *Polym. Bull.* **2011**, *67* (7), 1237–1244.
 - (49) Netsomboon, K.; Suchaooin, W.; Laffleur, F.; Pr fert, F.; Bernkop-Schn rch, A. Multifunctional Adhesive Polymers: Preactivated Thiolated Chitosan-EDTA Conjugates. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *111*, 26–32.
 - (50) Yang, X.; Zhao, Y.; Mussana, H.; Tessema, M.; Liu, L. Characteristics of Cotton Fabric Modified with Chitosan (CS)/Cellulose Nanocrystal (CNC) Nanocomposites. *Mater. Lett.* **2018**, *211*, 300–303.

- (51) Chen, J.; Huang, L.; Lai, H.; Lu, C.; Fang, M.; Zhang, Q.; Luo, X.; Chen†.Juan Lai†.Huixian, Lu†.Chenghao, H. L.; Chen, J.; Huang, L.; et al. Methotrexate-Loaded PEGylated Chitosan Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and in Vitro and in Vivo Antitumoral Activity. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (7), 2213–2223.
- (52) Thakur Aarzoo Kohli Kanchan, P. K.; Thakur, A.; Soni, K.; Kohli, K. Gold Nano-Conjugates: A Leap in Cancer Treatment. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2016**, *7* (6), 2252.
- (53) Marques, L. Ibuprofeno: Um Fármaco Com Sucesso. *Univ. Évora “Departamento e Cent. Química”* **2009**.
- (54) Monteiro, E. C. A.; Trindade, J. M. de F.; Duarte, A.; Chahade, W. H. Os Antiinflamatórios Não Esteroidais (AINEs). *Temas Reumatol. clÁnica* **2008**, *9* (2), 53–63.
- (55) Lin, Y.; Jing, W.; Kang, P.; Xiaoming, Z.; Zhouping, W.; Wenshui, X. Preparation and Characterization of Core/Shell-Type Ag/Chitosan Nanoparticles with Antibacterial Activity. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32* (4), 1277–1281.
- (56) Costa, P.; Sousa Lobo, J. M. Modeling and Comparison of Dissolution Profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13* (2), 123–133.
- (57) Shaw, R. Dynamic Light Scattering Training: Achieving Reliable Nano Particle Sizing. Malvern 2013.
- (58) Okuyama, K.; Noguchi, K.; Kanenari, M.; Egawa, T.; Osawa, K.; Ogawa, K. Structural Diversity of Chitosan and Its Complexes. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *41* (3), 237–247.
- (59) Mogilevskaya, E. L.; Akopova, T. A.; Zelenetskii, A. N.; Ozerin, A. N. The Crystal Structure of Chitin and Chitosan. *Polym. Sci. Ser. A* **2006**, *48* (2), 116–123.
- (60) Blachnio, M.; Budnyak, T. M.; Derylo-Marczewska, A.; Marczewski, A. W.; Tertykh, V. A. Chitosan-Silica Hybrid Composites for Removal of Sulfonated Azo Dyes from Aqueous Solutions. *Langmuir* **2018**, *34* (6), 2258–2273.
- (61) Kassaai, M. A Review of Several Reported Procedures to Determine the Degree of N-Acetylation for Chitin and Chitosan Using Infrared Spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *71* (4), 497–508.
- (62) Domard, A.; Rinaudo, M. Preparation and Characterization of Fully Deacetylated Chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **1983**, *5* (1), 49–52.
- (63) Lin, Y.; Yao, W.; Cheng, Y.; Qian, H.; Wang, X.; Ding, Y.; Wu, W.; Jiang, X. Multifold Enhanced T₂ Relaxation of ZnFe₂O₄ Nanoparticles by Jamming Them inside Chitosan Nanospheres. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (12), 5684–5693.
- (64) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L.; Silverstein Webster, F.

- X., Kiemle, D. J., R. M. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; John wiley & sons, 2005.
- (65) Freer, A. A.; Bunyan, J. M.; Shankland, N.; Sheen, D. B. Structure of (S)-(+)-Ibuprofen. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1993**, 49 (7), 1378–1380.
- (66) Michalak, I.; Mucha, M. The Release of Active Substances from Selected Carbohydrate Biopolymer Membranes. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87 (4), 2432–2438.
- (67) Kulkarni, P. V.; Keshavayya, J.; Kulkarni, V. H. Effect of Method of Preparation and Process Variables on Controlled Release of Insoluble Drug from Chitosan Microspheres. *Polym. Adv. Technol.* **2007**, 18 (10), 814–821.
- (68) Liu, W.; He, G.; Qian, Z. Preparation of Chitosan Nanocapsules and Their Release Properties. *Polym. Bull.* **2011**, 67 (7), 1237–1244.
- (69) Rasenack, N.; Müller, B. W. Ibuprofen Crystals with Optimized Properties. *Int. J. Pharm.* **2002**, 245 (1–2), 9–24.

7. CURRÍCULO

Ellen Luna de Barros

Resumo informado pela autora

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Estadual de Londrina (2011). Realizou estágio no Laboratório de Medicamentos da UEL(2009-2010). Atuou como analista no Controle de Qualidade na Indústria Química-Farmacêutica Cristália(2010) .Atualmente é Analista de Validação de Metodologia- Teva. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Produtos e, atuando principalmente nos seguintes temas: Validação Metodologias, e Instrumentação(HPLC,UV-Vis,IR, CG, Dissolutor).

Formação acadêmica/titulação

2006 - 2010 Graduação em Farmácia.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
Título: Controle de Qualidade Físico-Químico E Perfil de Dissolução de
Comprimidos de Furosemida, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Mirela Fulgencio Rabito

Atuação profissional

1. Teva Farmacêutica - TEVA

2017 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Validação de Metodologias ,
Carga horária: 8, Regime: Parcial
Outras informações:
Analista Validação de Metodologias Analíticas: atualmente Transferência de
Metodologias Analíticas em HPLC e UV-visível. Elaboração de Protocolos e Relatórios
de Validação. Elaboração de metodologia analítica e especificação para regularização
de pós-registro e renovação de registro de medicamentos.

2. Apsen Farmacêutica - APSEN

2016 - 2017 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista Desenvolvimento
Analítico/Validação , Carga horária: 8, Regime: Parcial
Outras informações:
Analista Validação de Metodologias Analíticas: atualmente Transferência de
Metodologias Analíticas em HPLC e UV-visível. Elaboração de Protocolos e
Relatórios de Validação. Elaboração de metodologia analítica e especificação para
regularização de pós-registro e renovação de registro de medicamentos.

3. Merck Sharp & Dohme Farmacêutica - MSD

2016 - 2016 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Validação de Metodologias , Carga
horária: 8, Regime: Parcial
Outras informações:
Analista Sênior Validação de Metodologias Analíticas e Limpeza: julho 2016 a outubro
2016. Transferência de Metodologias Analíticas em HPLC e UV-visível. Elaboração de

Protocolos e Relatórios de Validação.

4. Pfizer - PFIZER

2011 - Atual Vínculo: analista de controle qualidade , Enquadramento funcional: Analista de Controle de Qualidade, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Analista de Controle de Qualidade, atuando em análises de produto de estabilidade e rotina e transferência e validação de metodologias analíticas.

5. Laboratório Químico Farmacêutico Cristália - LTDA

2010 - 2010 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiaria Controle de Qualidade, Regime: Parcial
Outras informações:
Estagiaria na área de Controle de Qualidade Físico-Químico.

Produção bibliográfica

- Artigos completos publicados em periódicos

BARROS, E. L.; RABITO, M. F.; SANTOS, P. H.; NERY, M. M. F.

1. Controle de Qualidade Físico-Químico E Perfil de Dissolução de Comprimidos de Furosemida. Espaço para a Saúde (Online). , v.12, p.12 - , 2011.

- Apresentação de trabalho e palestra

BARROS, E. L.

1. **Superantígenos**, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)
BARROS, E. L.; SOUZA, F. C.; MENILLO, C.; SILVA, E.; FARIA, F. O.; FERREIRA, F. A. C.; LASSIE, F. S.; CHIYODA, F. A. S.; GASPARIN, F. G. M.; COSTA, E. M. O. D.
2. **Impacto das Ações de Educação em Saúde em Creche do Bairro Jardim do Sol, Londrina PR**, 2006. (Outra,Apresentação de Trabalho)